Allgemeine Richtlinien für die Bestimmung des C-Vitamins. Inwieweit ist das Vitamin C am Reduktionsvermögen der Gewürze beteiligt.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
in Frankfurt a. Main

vorgelegt von

Theo Harth
aus Mainz-Mombach (Rheinhessen).

1935

Paul Scheiner, Buchdruckerei und Verlagsanstalt, Würzburg.

Referenten: Dr. phil. habil. R. Strohecker,
Professor Dr. H. Dieterle.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 1935.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern!

Inhaltsangabe.

Einleitung 1

A. Allgemeiner Teil 3

I. Feststellung des Reduktionsvermögens 3

1. Art des Materials, Zerkleinerung 3

2. Extraktion 4

a) Kochauszüge mit Mineralsäuren 5

b) Kochauszüge mit Essigsäure 5

c) Kochauszüge mit Wasser 6

d) Kalte Auszüge 7

3. Die Titration mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol 8

a) Titration nach Tillmans 9

b) Nitrobenzolmethode und damit zusammenhängende Versuche 11

c) Titration nach Harris, Vorschläge von Nink 15

4. Weitere Titrationsmethoden 16

a) Prune 16

b) Lauth's Violett 17

c) Jod 18

d) Die Clark'schen Indikatoren 18

5. Erschöpfende Auszüge 18

6. Zusammenfassung 19

II. Bestimmungsmethoden für Vitamin C 19

1. Spontanreduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol 19

2. Lufteinwirkung 20

3. Haltbarkeit unter Stickstoff 20

4. Prunetitration in der Hitze, qualitativ 20

5. Zusatz von Ascorbinsäure 21

6. Zusammenfassung 23

III. Abtrennung der störenden Stoffe 23

1. Gerbstoffe der Katechin- und Tanninreihe 24

a) Formaldehyd-Salzsäure-Fällung 24

b) Essigsäure-Bleiazetat-Fällung 25

c) Aussalzen, weitere Methoden 27

2. Eisen-II-verbindungen 28

3. Wasserdampfdestillation 29

IV. Qualitative Nachweismethoden für die störenden Stoffe 30
V. Störende Spaltprodukte 30
1. Hydrolysezahl 31
2. Behandlung der kalten Auszüge 32
3. Verdünnungskurve 32
4. Qualitativer Nachweis 33
B. Spezieller Teil 33
1. Safran 34
2. Piment 44
3. Pfeffer 48
4. Thymian 50
5. Majoran 53
6. Paprika 55
7. Gewürze, deren Titration mit „glatt" bezeichnet wurde 58
Zusammenfassende Uebersicht 58
Schriftennachweis 61

Einleitung.

Das Vitamin C wurde durch Tierversuche aufgefunden und auch nach seiner Entdeckung durch Tierversuche nachgewiesen und bestimmt. Diese Versuche waren jedoch immer mit großem Zeitaufwand verbunden und ergaben naturgemäß quantitativ nur ungenaue Werte. Man war deshalb bestrebt, eine chemische Methode zu finden, die einen raschen — und wenn möglich quantitativen — Nachweis des C-Vitamins gestattete.

Als qualitatives Reagenz wurde von *N. Bezssonoff (1)* eine komplizierte Molybdän-Phosphor-Wolframsäure angegeben. Diese Reaktion hat sich jedoch als sehr wenig spezifisch für Vitamin C erwiesen. Eine Anwendung kann das *Bezssonoff'sche* Reagenz höchstens in negativem Sinne erfahren: Tritt bei Zusatz zu einem Extrakt die charakteristische blauviolette Färbung n i c h t auf, dann ist auch kein Vitamin C vorhanden. Eine entstehende Färbung läßt dagegen keine Schlüsse zu.

Eine quantitative Methode fand *J. Tillmans (2)* in der Titration von C-Vitamin-haltigen Lebensmitteln mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol. Sie beruht auf der Reduktionskraft des C-Vitamins und der dadurch bewirkten Entfärbung des genannten Farbstoffs. Auch diese Methode kann natürlich nicht absolut spezifisch sein, denn genau so wie das C-Vitamin reagieren alle diejenigen Stoffe mit dem Indophenolfarbstoff, deren Reduktions-Oxydations-Potentiale dem des C-Vitamins gleich oder fast gleich sind. Jedoch sind die Werte, die bei frischem Gemüse und Obst aus der Titration errechnet werden, praktisch allein dem Vitamin C zuzuschreiben, weil diese Lebensmittel nur ein Minimum an störenden Stoffen enthalten. Bei Naturprodukten aber, die durch Trocknen, Lagern usw. eine Veränderung erfahren haben, ist es nötig, von dem Gesamtreduktionsvermögen dasjenige möglicherweise vorhandener störender Stoffe abzuziehen, um den Gehalt an Vitamin C festzulegen. Für die Untersuchung ergibt sich hierbei also die Notwendigkeit, die störenden Stoffe von dem Vitamin C abzutrennen.

H. Nink (3) hat u. a. eine große Reihe von Gewürzauszügen titriert und bei einigen davon ein außerordentlich hohes Reduktionsvermögen gegenüber 2,6-Dichlorphenol-indophenol gefunden. So verbrauchte z. B. ein Auszug aus 10 g Nelken 700 ccm 0,001n Farbstofflösung. Die analogen Werte betrugen für Safran, ganz eingekauft, 750, für Safran, pulverisiert eingekauft, 650, für Piment 490 und für Pfeffer (schwarz) 300. *J. Effern (4)* hat es übernom-

men, das Reduktionsvermögen der Nelken aufzuklären, Aufgabe vorliegender Arbeit ist es zunächst, zu untersuchen, inwieweit das Vitamin C am Reduktionsvermögen der Gewürze Safran, Piment und schwarzer Pfeffer beteiligt ist.

Weiterhin interessieren dann unter den Gewürzen noch die beiden Kräuter Thymian und Majoran mit den verhältnismäßig hohen Reduktionsvermögen von 124 und 100.

Bekanntlich benutzt man neuerdings in Ungarn zur Darstellung des C-Vitamins frische Paprikafrüchte. Deswegen bezog ich auch Paprika in die Untersuchung mit ein, und zwar die handelsüblichen, getrockneten Schoten. Der von *H. Nink (3)* angegebene Farbstoffverbrauch für 10 g große Paprikaschoten ist 84 ccm.

In der Tabelle von *H. Nink (3)* ist neben den Zahlen, die den Farbstoffverbrauch für 10 g Gewürz angeben, noch durch die Worte „glatt", „mittel", oder „ziehend" die Art der Titration charakterisiert. Die Titration wurde mit „ziehend" bezeichnet, wenn die Farbe des auf blau titrierten Auszugs nach kurzer Zeit verschwunden war und neuer Farbstoff zugegeben werden mußte, um bestehenbleibende Färbung zu erreichen. War aber eine Spontanentfärbung zu beobachten, dann wurde die Titration mit „glatt" bezeichnet. Man hat bisher angenommen, daß die Werte, die durch Spontanreduktion gefunden werden, allein auf Vitamin C zurückzuführen sind. Deswegen bearbeitete ich auch noch kurz alle die Gewürze, deren Titration in der *Nink'schen* Tabelle mit „glatt" bezeichnet ist, also Salbei, weißer Pfeffer, Muskatnuß, Coriander, Macis, Fenchel, Kümmel, Anis, eingelegte Kapern.

Man hat sich in verschiedenen Arbeiten damit beschäftigt, die Titration nach *Tillmans* so zu gestalten, daß man auch in den Fällen gute Resultate erzielen kann, in denen das gefundene Reduktionsvermögen nicht allein auf Vitamin C zurückzuführen ist. Die Reihe dieser Methoden ist im Laufe der Zeit so angewachsen, daß es einmal notwendig war, sie alle durchzuprüfen und das Brauchbare von dem Unbrauchbaren abzusondern. Bei der Untersuchung der vorgenannten Gewürze kommen alle diejenigen Vorschriften in Anwendung, welche sich im allgemeinen gut bewährt haben und zur endgültigen Feststellung ihrer Brauchbarkeit auch die, über deren Güte man sich noch nicht einig war. Um ein vollkommen abgerundetes Bild über das bisher Erarbeitete zu erhalten, werden auch kurz die Methoden gestreift, die bei ihrer Anwendung negative Resultate zeigten oder nur in ganz wenigen Ausnahmefällen angewandt werden konnten.

A. Allgemeiner Teil.

Man hat zum chemischen qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des C-Vitamins bis heute noch keine absolut spezifische Reaktion gefunden. Ob es in einem Lebensmittel vorkommt oder nicht und in welcher Menge es darin vorhanden ist, muß aus dem Gesamtbild der Ergebnisse verschiedener Untersuchungsmethoden festgestellt werden. In diesem Sinne wurden auch die eingangs erwähnten Gewürze bearbeitet. Je nach dem eigentlichen Zweck der angewandten Methoden kann man diese in vier größere Gruppen einteilen:

1. Methoden zur Feststellung des Reduktionsvermögens.
2. Nachweismethoden für das Vitamin C.
3. Methoden zur Abtrennung der störenden Stoffe.
4. Nachweismethoden für die störenden Stoffe.

Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen seien an dieser Stelle aufgeführt, soweit sie den Allgemeinen Teil betreffen:

R.V. bedeutet Reduktionsvermögen. Die angegebenen Titrationswerte beziehen sich immer auf 10 g Ausgangsmaterial oder sind näher erläutert. R.V.= 20 bedeutet also: 10 g Ausgangsmaterial titrieren 20 ccm n/1000 Farblösung.

H_2O_v bedeutet vorbehandeltes Wasser. Darunter versteht man luftfreies, destilliertes Wasser, dessen Herstellung im Kapitel „Kochauszüge mit Essigsäure" angegeben ist.

E_{20} bedeutet 20%ige Essigsäure.

F.L. bedeutet Farblösung. Darunter versteht man die 0,001n Lösung des Farbstoffs 2,6-Dichlorphenol-indophenol.

I. Feststellung des Reduktionsvermögens.

1. Art des Materials, Zerkleinerung.

Es kam in vorliegender Arbeit nicht darauf an, irgendwelche besonders gute Arten von Gewürzen herauszugreifen, es sollte vielmehr eine ganz beliebige Sorte, wie sie sich gerade im Handel befand, untersucht werden. Es wurden an verschiedenen Stellen Proben eingekauft und zuerst von jeder dieser Proben das Reduktionsvermögen (R.V.) bestimmt. Wenn zur Durchführung der einzelnen Methoden immer diejenige Gewürzsorte den Vorzug fand, welche nach einer bestimmten Norm das höchste R.V. hatte, so ist der Grund darin zu suchen, daß man die Differenzen des Re-

duktionswertes vor und nach einer bestimmten Behandlung bei höheren Werten genauer errechnen kann als bei geringen. — In manchen Fällen wandte ich gleiche Methoden auf verschiedene Sorten eines Gewürzes an, jedoch zeigten sich bei diesen Parallelversuchen mit geringen Ausnahmen keine nennenswerten Unterschiede in den Verhältniszahlen der Titrationswerte vor und nach der Durchführung der betreffenden Bearbeitung.

Um das R.V. eines Lebensmittels feststellen zu können, muß man es gewöhnlich vor dem Extrahieren zerkleinern. Vor allen Dingen ist darauf zu achten, daß die Zerkleinerung immer so vor sich geht, daß die Substanz vor Lufteinwirkung weitgehendst geschützt wird. Wegen der großen Luftempfindlichkeit des möglicherweise vorhandenen C-Vitamins muß man das Material deshalb gleich nach dem Zerkleinern unter Stickstoff oder Kohlensäure setzen. Außerdem darf die Zerkleinerung nur mit Geräten aus nichtrostendem Stahl vorgenommen werden, da Eisen die Titration stört. Es ist aus diesem Grunde auch falsch, etwa die Gewürze in einer Gewürzmühle zu mahlen, da hierbei eine Beimengung von Eisenteilchen unausbleiblich ist. In erster Linie ist das Zerstoßen und Zerreiben im Porzellanmörser zu empfehlen. Einige Gewürze konnten ohne vorherige Behandlung extrahiert werden. Nähere Angaben über die Zerkleinerung sind jeweils an den entsprechenden Stellen selbst gemacht.

2. Extraktion.

Als Norm für die Extraktion legte ich folgende Mengenverhältnisse zugrunde: Die Auszugsflüssigkeit betrug immer das Vierfache der zu extrahierenden Gewürzmenge und wurde nach Beendigung der Extraktion im Meßkolben auf das Fünffache aufgefüllt. Nach Durchführung der verschiedenen später besprochenen Untersuchungsmethoden lag stets eine Flüssigkeitsmenge vor, die einem Gewürzgehalt von 10% entsprach. Um 1000 ccm titrationsfertigen Auszug zu erhalten, verfuhr ich also folgendermaßen:

1. Extraktion von 100 g Gewürz mit 400 ccm Extraktionsmittel (25% Gewürzgehalt).

2. Abgießen der Auszugsflüssigkeit, Auffüllen im Meßkolben auf 500 ccm (entspricht 20% Gewürzgehalt).

3. Für die erste Titration und zur Ausführung der Einzeluntersuchungen und Reaktionen Verdünnung auf das Doppelte, insgesamt also von 500 auf 1000 ccm (entspricht 10% Gewürzgehalt).

Bei voluminösem Material und wegen des hohen Preises auch bei Safran benutzte ich Ansätze, deren Gehalt an Gewürz nur die Hälfte betrug. Abweichungen von dieser Norm waren in Ausnahmefällen nötig, jedoch sind sie stets durch einen besonderen Hinweis an den entsprechenden Stellen hervorgehoben.

a) Kochauszüge mit Mineralsäuren.

Bisher verfuhr man zur Feststellung des Gehaltes an reduzierendem Stoff in Lebensmitteln so, daß man Auszüge titrierte, die man durch kurzes Kochen mit verdünnter Schwefelsäure unter Durchleiten von Stickstoff erhalten hatte. Man sah den Hauptvorteil gegenüber den wässerigen Auszügen (kalt oder kochend) darin, daß man nach dieser Methode schon bei einmaligem Extrahieren das gesamte R.V. erfassen konnte, während bei Anwendung von Wasser eine wiederholte Behandlung nötig war. Die Anwendung dieser Mineralsäure-Kochauszüge darf aber nicht ohne weiteres auf getrocknete pflanzliche Erzeugnisse ausgedehnt werden, denn *K. Enßlin (5)* z. B. hat in verschiedenen kalten wässerigen Auszügen (u. a. bei Heu) nach Abtrennung des extrahierten Materials anfänglich kein R.V. erhalten, durch Kochen der Flüssigkeit mit Säure jedoch hohe Titrationswerte festgestellt. In diesen Fällen entstand also aus einem wasserlöslichen Körper ohne R.V. durch Hydrolyse ein solcher mit R.V. Dieser Körper hat aber nichts mit dem Vitamin C zu tun, denn das Vitamin C behält sein R.V. unverändert bei, eine Erhöhung des R.V. durch Hydrolyse ist bei ihm unmöglich. Es ist nach diesen Resultaten also nicht angebracht, zur Feststellung des R.V. den Kochauszug mit Mineralsäure zu benutzen. Er kam aus diesen Gründen in der vorliegenden Arbeit im allgemeinen nicht mehr in Anwendung.

b) Kochauszüge mit Essigsäure.

Wie *H. Beier (6)* zeigt, kann man auch schon mit 0,2%iger Essigsäure genügend quantitativ ausziehen. Der Hauptanteil des R.V. befindet sich meistens schon nach der ersten essigsauren Kochextraktion in der Auszugsflüssigkeit. 0,2%ige Essigsäure bewirkt außerdem meist nur eine sehr geringe Hydrolyse, essigsaure Kochauszüge sind demnach empfehlenswert. Auch in vorliegender Arbeit war die Hauptauszugsart der essigsaure Kochauszug. Eine genaue Beschreibung der Arbeitsweise sei deshalb hier anhand eines Beispiels wiedergegeben:

Zuerst wird destilliertes Wasser durch etwa 10 Minuten langes Auskochen luftfrei gemacht, dann unter Eiskühlung Stickstoff eingeleitet. 400 ccm dieses vorbehandelten Wassers (H_2O_v) werden mit 4,0 ccm 20%iger Essigsäure (E_{20}) versetzt und zu 100 g Gewürz gegeben, das sich bereits in einem 1000 ccm-Kolben unter Stickstoff befindet. (Es wird wegen der leichten Oxydierbarkeit des C-Vitamins stets unter Stickstoff gearbeitet, auch wenn dies nicht immer besonders hervorgehoben wird.) Sodann wird am Rückflußkühler genau 30 Minuten gekocht. Es ist nicht nötig, während des Kochens Stickstoff einzuleiten, denn der aus dem H_2O_v entweichende Stickstoff macht zusammen mit dem entstehenden Wasserdampf einen Luftzutritt unmöglich. Nach dem Kochen wird der Kolben sofort in Eiswasser gestellt und Stickstoff eingeleitet. Durch diese Behandlung ist die Gewähr gegeben, daß das evtl. vorhandene Vitamin C praktisch nicht angegriffen wird, wie durch einen Blindversuch nachgewiesen wurde:

Mit H_2O_v verdünnter Zitronensaft wurde 0.2%ig essigsauer 30 Minuten lang am Rückflußkühler gekocht, danach sofort in Eiswasser unter Stickstoff gehalten und dann titriert. Während der Verbrauch an Farblösung (F.L.) für 10 ccm verdünnten Zitronensaft vorher 2,4 ccm war, betrug er nach dieser Behandlung noch 2,3.

Nach vollkommener Abkühlung wird der Auszug durch Gaze in einen 500 ccm-Meßkolben gegossen — auch dieser war vorher mit Stickstoff gefüllt worden — und nach Zugabe von 1,0 ccm E_{20} mit H_2O_v bis zur Marke aufgefüllt. Die E_{20} hält man sich am besten in einer Bürette vorrätig, weil man dann in der Lage ist, die gewünschte Essigsäurekonzentration rasch und genau zu erreichen. Die Auszugsflüssigkeit und der fertige Auszug haben danach einen Gehalt von 0.2% Essigsäure. Ergänzend sei noch erwähnt, daß der extrahierte Rückstand vor dem Auffüllen dreimal mit wenig H_2O_v ausgewaschen wurde.

c) Kochauszüge mit Wasser.

Ist R.V. beim Kochen mit Säure durch Hydrolyse entstanden, so wird man die gleiche Beobachtung in verringertem Maße auch beim Kochen mit Wasser machen können. Die Hydrolysestärke nimmt in der Reihenfolge Wasser, Essigsäure, Mineralsäure zu. Den Auszug mit kochender Essigsäure kann man aber dem mit kochendem Wasser deshalb vorziehen, weil ein saures Medium bekanntlich dem Vitamin C mehr Schutz bietet als ein neutrales. Ein

Kochauszug mit Wasser kam in dieser Arbeit nur in Form des Rückstandes der Wasserdampfdestillation zur Titration.

d) Kalte Auszüge.

Um die Hydrolyse bei der Extraktion auf ein Minimum herabzusetzen, liegt es nahe, den kalten Auszug als beste Art der Extraktion in den Vordergrund zu stellen. Theoretisch sei dazu folgendes bemerkt: Es ergeben sich zwei Fälle, entweder der Auszug zeigt R.V., dann muß nachgewiesen werden, ob es auf C-Vitamin zurückzuführen ist oder nicht — oder aber der Auszug zeigt kein R.V., dann ist man geneigt, zu behaupten, daß kein Vitamin C vorhanden ist. Dieser Ansicht können aber zwei Gründe entgegengehalten werden. Einmal wird man behaupten, die Lockerung der Pflanzenzellen sei bei der Einwirkung von kaltem Wasser zu gering, es sei daher möglich, daß das Vitamin C viel zu fest eingeschlossen und auf diese Art nicht herauszulösen sei. Dieser erste Grund wird in den Fällen, in denen das R.V. von 0 durch Kochen auf einen bestimmten Wert ansteigt, durch folgende Ueberlegung widerlegt: Das Ansteigen des R.V. gibt den Beweis, daß ein bestimmter Körper aus den Pflanzenzellen extrahiert worden ist. Es ist unmöglich, daß das leicht wasserlösliche Vitamin C dabei zurückgeblieben ist. Bleibt jedoch auch nach dem Kochen das R.V. $= 0$, dann kann der Einwand mit dieser Ueberlegung nicht widerlegt werden. Für diesen Fall sind weitere Methoden hinzuzuziehen, die das Fehlen von Vitamin C endgültig beweisen. Allerdings hat man in Fällen, in denen ein C-Vitamingehalt bekannt war, bisher noch nie die Feststellung gemacht, daß kalte Auszüge kein R.V. zeigten.

Der Ansicht, daß kein Vitamin C vorhanden ist, wenn sich im kalten Auszug kein R.V. zeigt, kann weiterhin entgegengehalten werden, daß die Auszugszeit zu kurz ist — dann wäre das Vitamin C noch nicht extrahiert, oder aber, daß sie zu lang ist — dann wäre das extrahierte Vitamin C, vor allem, wenn es sich nur um geringe Mengen handelt, schon wieder zerstört. Dieser Einwand wurde einfach dadurch hinfällig gemacht, daß der kalte Auszug als Reihenversuch angesetzt wurde, d. h. das R.V. wurde in verschiedenen Zeitabständen gemessen.

Was die praktische Durchführung der kalten Auszüge anbelangt, so sei auch hier wieder die Arbeitsweise am Beispiel erläutert. Für jedes Gewürz setzte ich zwei Versuchsreihen an:

Reihe 1) Kalter wässeriger Auszug.
Fünfmal 20 g Gewürz (bezw. 10 g bei voluminösen Gewürzen und Safran) wurden mit je 80 ccm H_2O_v in fünf Kölbchen unter Stickstoff im Eisschrank aufbewahrt. Nach 4, 8, 20, 24 und 48 Stunden wurde je ein Ansatz untersucht. Vor der Titration wurde durch Gaze geschüttet, der Rückstand dreimal mit wenig H_2O_v ausgewaschen und mit 1,0 ccm E_{20} und H_2O_v auf 100 ccm aufgefüllt.

Reihe 2) Kalter essigsaurer Auszug.
Eine Abänderung erfährt diese Reihe dadurch, daß nicht mit Wasser, sondern mit 0,2%iger Essigsäure extrahiert wurde; außerdem führte ich hier nur zwei Titrationen aus, und zwar nach 4 und nach 20 Stunden.

3. Die Titration mit 2.6-Dichlorphenol-indophenol.

Wie eingangs erwähnt (s. S. 1), schlägt *J. Tillmans (2)* zur Feststellung des Gehaltes an Vitamin C in Lebensmitteln die Titration der Auszüge mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol vor. Dieser Farbstoff spricht schon auf sehr schwache Reduktionsmittel mit Farbwechsel zur Leukoform, also Entfärbung, an. *J. Tillmans (7)* betont zwar ausdrücklich, daß man nicht erwarten kann, daß aus dem außerordentlich komplizierten Gemisch der Komponenten der lebenden Substanz nur ein ganz bestimmter Stoff auf diesen Indikator ansprechen wird, stellt jedoch fest, daß bei den meisten pflanzlichen Lebensmitteln in der Hauptsache doch nur ein ganz bestimmter Bestandteil auf den Farbstoff einwirkt. Dieser Bestandteil ist nach *Tillmans* das Vitamin C, die Ascorbinsäure. Einwandfrei und nahezu quantitativ ist die Bestimmung, wie schon oben gesagt (s. S. 1), bei frischem Gemüse und Obst. Hier ist der Ascorbinsäuregehalt so groß, daß die verbrauchte Farbstoffmenge direkt darauf umgerechnet werden kann. Bei anderen Lebensmitteln jedoch, insbesondere bei solchen, die eine Lagerung oder Haltbarmachung erfahren haben, bevor sie an den Verbraucher gelangen, ist die Titration mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol nicht mehr spezifisch. In vorliegender Arbeit wurde sie stets als Leitreaktion benutzt. Inwieweit das R.V. bei einer bestimmten Fällung in der Lösung zurückblieb oder in den Niederschlag gegangen war, wie sich das R.V. bei Lufteinwirkung oder unter Stickstoff verhielt, ob es mit Wasserdampf flüchtig war usw., das alles konnte mit der Farbstofftitration festgestellt werden.

War die Tatsache, daß kein Vitamin C vorhanden ist, dadurch bewiesen, daß der kalte Auszug kein R.V. zeigte, nach dem Kochen

mit Säure aber Farbstoff verbraucht wurde, dann wurde mit dem essigsauren Kochauszug weitergearbeitet, um die Entstehung des R.V. aufzuklären. Zeigte der kalte Auszug schon R.V., dann mußte zuerst nachgewiesen werden, ob dieses auf Vitamin C zurückzuführen ist oder nicht. Dazu wurden die später angegebenen Untersuchungsverfahren angewendet.

Zur Titration wird eine 0,001n Farbstofflösung (F.L.) benutzt. Die Menge des einzuwiegenden Farbstoffs schwankt je nach dem Reinheitsgrad erheblich. Das theoretische Aequivalentgewicht ist 134,0, es mußten von dem von der Firma *Schuchardt* G.m.b.H., Görlitz, bezogenen Farbstoff 0,165 g eingewogen werden, um auf eine Normalität von 0,001 zu kommen. Die F.L. wird gegen Mohr'sches Salz eingestellt, wie dies *J. Tillmans und Mitarbeiter (8)* angeben.

a) Titration nach *Tillmans.*

Die Ausführung der Titration des schwefelsauren Kochauszugs gestaltet sich nach *J. Tillmans (2)* so, daß die Hauptmenge der Schwefelsäure zunächst mit starker Natronlauge abgestumpft und die noch saure Flüssigkeit mit festem Natriumazetat versetzt wird. So sind in dem Auszug jetzt nur noch freie Essigsäure und überschüssiges Natriumazetat vorhanden, wodurch die für die Titration geeignetste Wasserstoffionenkonzentration erreicht ist. Bei der Untersuchung der Gewürze kamen Auszüge zur Verwendung, die 0,2%ig essigsauer waren. Ein Zusatz von Natronlauge war hierbei also nicht nötig, eine Spatelspitze Natriumazetat genügte, um die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration zu erhalten. Die Titration ist beendet, wenn die Flüssigkeit eine bestehenbleibende Blaufärbung angenommen hat.

K. Trillhose (9) beobachtete als Erster, daß bei der Titration nach *Tillmans* zwei Arten des Reduktionsvorgangs zu unterscheiden sind. In einigen Fällen verlief die Reduktion schnell, glatt und gut reproduzierbar, in anderen dagegen langsam, ziehend und so, daß man genaue Resultate garnicht feststellen konnte, wenn man sich nicht auf eine bestimmte Zeit festlegte. Wie sich herausstellte, handelte es sich in frischbereiteten Auszügen immer nur dann um Vitamin C, wenn der Farbstoff spontan entfärbt wurde.

Der Farbumschlag des 2,6-Dichlorphenol-indophenol von blau in rot wird mit p_H 4 bis 5 angegeben (siehe z. B. *K. Trillhose (9)*!). Eine Nachprüfung bestätigte diese Angabe. Den entsprechenden Versuch gestaltete ich folgendermaßen: In 12 gleiche,

dickwandige Reagenzgläser brachte ich je 20 ccm destilliertes Wasser, 1,0 ccm E_{20} und 0,5 ccm F.L. Dann gab ich abnehmende Mengen 3%ige Natriumazetatlösung aus einer Bürette zu, sodaß die p_H-Zahl langsam abfiel. Die p_H-Werte wurden mit dem p_H-Messungsapparat der Firma *Lautenschläger,* Frankfurt a. M., gemessen, der die Indikatorfolien nach Wulff zur Basis hat. Aus der folgenden Tabelle ist zu ersehen, daß das Gebiet des Farbstoffumschlags zwischen 4,4 und 5,2 liegt.

Nr.	zugesetzte Menge Na-azetat	p_H	Farbe	Nr.	zugesetzte Menge Na-azetat	p_H	Farbe
1	2,0	5,2	blau	7	0,8	4,2	rot
2	1,8	5,2	blau	8	0,6	4,0	rot
3	1,6	5,0	bläulich	9	0,4	3,8	rot
4	1,4	4,8	bläulich	10	0,2	3,6	rot
5	1,2	4,6	nach rot	11	0,1	3,5	rot
6	1,0	4,4	übergehend	12	0,0	2,6	rot

Eine Aenderung erfuhr die Titration nach *Tillmans* im Laufe der Zeit insofern, daß man das Natriumazetat zum Abstumpfen der Auszüge erst dann zusetzte, wenn man bereits auf rot titriert hatte. Zusammenfassend charakterisiert diese Arbeitsweise *H. Beier (6)* in folgendem Sinne:

„Es (das Titrieren) wird zweckmäßig im essigsauren Auszug ohne Natriumazetatzugabe vorgenommen, also auf rot titriert. Dann erst gibt man Natriumazetat zu und titriert weiter zum Blauumschlag. Sind beide verschieden, ... so gilt der rote Umschlagspunkt für Vitamin."

Mit anderen Worten: Hat man also gefunden, daß ein Auszug, den man auf rot titriert hat, sich nach Zugabe von Natriumazetat entfärbt und muß man noch nennenswerte Mengen F.L. zugeben, um Blaufärbung zu erreichen, dann darf man nur den Wert für Vitamin C in Rechnung setzen, den man für Rotfärbung erhalten hat.

Ergänzend fügt *K. Enßlin (5)* diesen Ausführungen hinzu, daß schlechte Uebereinstimmung der Titrationswerte im roten und im blauen Gebiet darauf hindeutet, daß entweder neben dem Vitamin C noch andere reduzierende Körper vorliegen oder daß überhaupt kein C-Vitamin vorhanden ist.

Bei der Untersuchung der Gewürze nahm ich die Titration nach *Tillmans* in der ursprünglichen Form nur deshalb vor, um festzustellen, wie die hohen Werte von *H. Nink (3)* im Gegensatz

zu den hier gefundenen zustande kamen. Auf rot konnte dabei nicht titriert werden, weil durch die Färbung der Auszüge eine rote Farbe nicht zu erkennen war. Bei der Titration auf blau stellten sich gewöhnlich zuerst Mischfarben ein, die weder der des Auszugs, noch der des blauen Farbstoffs glichen. Alle Titrationen verliefen stark ziehend. Als endgültige Werte gebe ich diejenigen an, welche sich errechneten, wenn die zugesetzte Menge Farbstoff eine mindestens 2 Minuten anhaltende Färbung bewirkte, die einen deutlich blauen Ton hatte. Im allgemeinen mußte die nachstehend beschriebene Nitrobenzolmethode angewandt werden.

b) Nitrobenzolmethode und damit zusammenhängende Versuche.

Man kann bei gefärbten Auszügen den Endpunkt der Titration, also die beginnende Färbung des Auszuges durch den Indophenolfarbstoff, garnicht oder nur sehr ungenau erkennen. Es lag der Gedanke nahe, eine wasserunlösliche Flüssigkeit zu suchen, mit der man überschüssig zugesetzten Indophenolfarbstoff aus dem Auszug ausschütteln kann. Der anzuwendende Stoff durfte allerdings nicht gleichzeitig die Pflanzenfarbstoffe mitausschütteln. Als geeignet hierfür wurde von *F. Siebert (10)* Nitrobenzol vorgeschlagen. Ist der Endpunkt der Titration erreicht, so geht der Ueberschuß des Farbstoffs beim Ausschütteln in das Nitrobenzol über und färbt dieses. *Siebert* bringt als Beispiel die Titration von Rotkrautsaft und schreibt darüber folgendes:

„In Zentrifugenröhrchen von etwa 1½ cm lichter Weite wurden je 5 ccm Nitrobenzol mit je 1 ccm Rotkrautsaft und 2 ccm dest. Wasser überschichtet. Vor der Titration mit der Farblösung wurde mit wenigen Tropfen 20%iger Essigsäure angesäuert. Der Zusatz der Farblösung erfolgte vorsichtig ohne Umschütteln. Die Verteilung in der wässerigen Phase geschah lediglich durch leichtes Umschwenken. Nach einer ½ Minute wurde vorsichtig und nicht zu heftig geschüttelt, so, daß immer noch eine kleine Menge Nitrobenzol am Boden des Röhrchens blieb. Nach kurzem Stehen trennten sich die beiden Flüssigkeiten wieder.

Eine kleine Tabelle mag bei diesem Parallelversuch die Uebersicht erleichtern:

Röhrchen	ccm Farblösung	Farbe des Nitrobenzols
1	0	grünlichgelb
2	3	unverändert grünlichgelb

Röhrchen	ccm Farblösung	Farbe des Nitrobenzols
3	3,4	leicht verändert nach rötlichgelb
4	3,6	deutlich rötlichgelb
5	4	rotgelb
6	5	rot

Den Umschlag zeigt also Röhrchen 4. Bei Röhrchen 3 war die Aenderung des Farbtones gerade eben zu erkennen."

Es wurde also hierbei immer in saurem Gebiete titriert. Es ist zwar etwas umständlich, daß man die Titration als Parallelversuch mit mehreren Röhrchen ausführen muß, jedoch ist dieser Nachteil zu Gunsten der Genauigkeit der Bestimmung in Kauf zu nehmen. Durch einen rohen Vorversuch ermittelt man zuerst den ungefähren Titrationswert. So setzt man z. B. anfangs 5, 10, 15, 20 ccm n/1000 Farblösung zu. Findet man den Wert dann zwischen 0 und 5, so werden zu vier neuen Proben 1, 2, 3, 4 ccm zugesetzt, wobei dann z. B. ein Wert zwischen 3 und 4 gefunden wird. Bei vier weiteren Proben setzt man nun 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 ccm F.L. zu, wobei sich nun der endgültige Wert ergibt, wenn man nicht noch auf 0,1 ccm Differenz titrieren will.

K. Enßlin (5) arbeitet in stark essigsauren statt in schwach essigsauren Lösungen. An sich spielt die Konzentration der Essigsäure hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Wichtig ist, daß in einem Gebiet gearbeitet wird, in dem die p_H-Zahl kleiner ist als 3,5. Dies konnte ich durch einen Versuch beweisen, der genau dem entsprach, wie er zur Feststellung des Farbumschlags ausgeführt wurde (s. S. 9). Aus den Lösungen mit den verschiedenen p_H-Werten konnte der Farbstoff nur dann ausgeschüttelt werden, wenn die p_H-Zahl 3,5 oder kleiner war. Von 3,6—3,8 ging er nur unvollkommen in das Nitrobenzol über und oberhalb 3,8 war ein Ausschütteln überhaupt nicht mehr möglich. Ob ein 0,2%ig essigsaurer Auszug mit Hilfe von Nitrobenzol titriert wird oder ein Auszug, dessen Essigsäuregehalt wesentlich höher ist, das hat auf die Titrationsergebnisse praktisch keinen Einfluß, auf jeden Fall ist das Medium hierbei immer so sauer, daß die p_H-Zahl kleiner ist als 2,6. Auch von Farbstoffzerstörung, wie sie bei starken Mineralsäuren auftritt, kann bei Essigsäure keine Rede sein. Gibt man zu 20 ccm Eisessig 0,2 ccm F.L., so ist die Rosafärbung nach Stunden noch unverändert vorzufinden.

Bei Versuchen über die Zerstörungskraft der Schwefelsäure erhielt ich folgende Resultate: 10 ccm n-Schwefelsäure entfärben bis 0,6 ccm F.L. schon in wenigen Sekunden, bis zu 2,0 ccm in-

nerhalb 2 Minuten, 2—6 ccm in 4—5 Minuten. Selbst Lösungen, die bis 16 ccm F.L. enthalten, sind nach 10 Minuten nur noch sehr schwach rosa gefärbt. Aehnlich verhält sich die n/2-Schwefelsäure. 10 ccm hiervon entfärben 0,2—1,0 ccm in ca. 3 Minuten, nach 5 Minuten sind bis zu 5 ccm zerstört. Bei n/10-Schwefelsäure macht sich eine Farbstoffzerstörung nur wenig mehr bemerkbar, bei n/100-Schwefelsäure tritt sie überhaupt nicht mehr in Erscheinung.

Versuche über die Einwirkung von Salpetersäure und Salzsäure wurden früher schon von *K. Trillhose (9)* ausgeführt. Auch diese beiden Säuren zerstören den Farbstoff.

Eine Verbesserung der Nitrobenzolmethode nimmt *K. Enßlin (5)* insofern vor, als er als richtigen Titrationswert nicht wie *Siebert* den annimmt, bei dem das Nitrobenzol schon deutlich rötlichgelb gefärbt ist, sondern als richtig den Wert in Rechnung setzt, bei dem das Nitrobenzol gerade noch grünlichgelb gefärbt ist. Ist das Nitrobenzol schon gefärbt, dann ist doch bereits ein Farbüberschuß vorhanden, die wirklich notwendige Farbstoffmenge also bereits überstiegen.

Eine weitere Aenderung der Vorschrift nach *Siebert* ergibt sich aus folgender Ueberlegung: Es ist unvermeidlich, daß das Nitrobenzol bereits nach dem Zugeben des Farbstoffs und besonders beim Schütteln, auch wenn dies noch so vorsichtig geschieht, geringe Mengen von diesem aufnimmt, ohne daß sie zur Titration des Auszuges benutzt werden können. Es ist also richtiger, zu dem Auszug zuerst die F.L. zuzugeben und erst nach dem Umschütteln dann das Nitrobenzol unterzuschichten.

Es ist unbedingt nötig, die Zeit der Einwirkung des Farbstoffs auf den Auszug genau konstant zu halten. Bei Auszügen, die nur Vitamin C enthalten, erhält man infolge der Spontanreduktion immer die gleichen Werte, ob man nun zwischen F.L.-Zugabe und Ausschütteln nur ganz kurze Zeit wartet oder länger. Bei Stoffen aber, die ohne Nitrobenzol ziehend titrieren, ist das Konstanthalten einer bestimmten Zeitspanne unerläßlich. *F. Siebert (10)* hat sich auf ½ Minute festgelegt, *K. Enßlin (5)* wartet zwischen F.L.-Zugabe und Ausschütteln ebenfalls ½ Minute, bei einigen Titrationen eine volle Minute.

Selbstverständlich sind alle Werte, die mit Hilfe der Nitrobenzolmethode bei ziehend titrierendem Material gefunden werden, nur relativ. Wartet man 1 Minute, dann erhält man kleinere Werte als bei einer Wartezeit von 3 Minuten. Der Gedanke liegt nahe, eine Wartezeit als Basis anzunehmen, die einerseits so lange

bemessen ist, daß gerade das C-Vitamin vollkommen erfaßt wird, die aber andererseits so kurz ist, daß ein anderer, ziehender Stoff noch nicht mit der F.L. reagieren kann, mit anderen Worten also, daß die Spontanreduktion auf die Nitrobenzolmethode übertragen wird. Dies scheitert jedoch daran, daß man einmal von dem C-Vitamin nicht weiß, ob es auch dann noch in der Lage ist, spontan zu reagieren, wenn es in nur geringen Mengen neben viel anderem reduzierenden Stoff vorliegt, und daß es zum andern Stoffe gibt, die den Farbstoff genau so spontan entfärben wie das Vitamin C. Ein Beispiel für den letzteren Fall fand ich in dem reduzierenden Stoff des Piments.

Die Titration nach der Nitrobenzolmethode kann also nicht dazu dienen, das absolute Gesamtreduktionsvermögen eines Lebensmittels festzustellen, das wenig Vitamin C und viel störenden Stoff enthält, weil man immer nur relative Werte erhalten kann. Hält man aber die Einwirkungszeiten der F.L. bei allen Titrationen konstant, dann kann man wenigstens aus den Titrationswerten vor und nach einer bestimmten Behandlung genau erkennen, in welchem Verhältnis sich das R.V. durch diese Behandlung geändert hat.

Schematisch sieht die Nitrobenzolmethode, so wie ich sie bei der Untersuchung der Gewürze nach eingehenden theoretischen und praktischen Studien in präzisierter Form angewandt habe, folgendermaßen aus:

Zeit:	Titrationsstadium:
Anfang	Zugabe der F.L., höchstens 5 Sek. lang,
sofort danach	zweimaliges Umdrehen des mit Gummistopfen verschlossenen Zentrifugenrohres,
nach genau 2¾ Min.	Unterschichten von 4 ccm Nitrobenzol,
nach genau 3 Min.	zweimaliges Umdrehen wie oben,
nach genau 3¼ Min.	ebenso,
nach genau 6 Min.	viermaliges kurzes Umschütteln des unteren Teiles des Zentrifugenrohres.

Vor dem Einfüllen der Auszugsflüssigkeit (je 20 ccm) wurden die Zentrifugenröhrchen mit Stickstoff gefüllt. — Die Einwirkungszeit des Farbstoffs betrug also immer 3 Minuten. Durch das Umdrehen nach 3 und 3¼ Minuten ist der überschüssige Farbstoff quantitativ in das Nitrobenzol übergegangen. Eine genau so behandelte Blindprobe mit Wasser und ebenso eine solche mit einem wenig gefärbten Auszug ohne reduzierenden Stoff bewiesen das, denn das überstehende Wasser war restlos entfärbt, der Auszug glich einer gleichen Auszugsprobe ohne F.L. vollkommen. — Nach

diesem Umschütteln setzte sich der Hauptteil des Nitrobenzols sofort klar ab, ein geringer Teil schwebte in feinster Tröpfchenform in der Lösung und setzte sich langsam auf der Hauptmenge ab, ohne sich gleich damit zu vermischen. Um diese mit Farbstoff besonders stark beladenen kleinsten Tröpfchen mit der Hauptmenge zu homogenisieren, wurde nach 6 Minuten zum dritten Mal umgeschwenkt.

Ordnet man zum Schluß die einzelnen Röhrchen nach fallenden F.L.-Mengen und fügt an das Ende dieser Reihe einen Blindversuch an (F.L. = 0 ccm, Zeiten genau wie oben), dann ist der richtige Titrationswert leicht zu erkennen. Genau nach den hier ausgeführten Angaben arbeitend, ist die Nitrobenzolmethode bezüglich ihrer Genauigkeit vollkommen einwandfrei, da man selbst die Nitrobenzolschichten mit nur 0,1 ccm F.L. Differenz gut voneinander unterscheiden kann.

Tritt bei einem oder dem anderen Stoffe nach dem Umdrehen Emulsionsbildung ein, so führt die Zuhilfenahme der Zentrifuge zur Schichtentrennung, sodaß auch hier gute Resultate erzielt werden. Je klarer die Lösung zur Titration kommt, desto geringer ist die Gefahr der Emulsionsbildung. Man zentrifugiert die Auszüge deshalb am besten schon gleich nach ihrer Fertigstellung, wenn sie nicht sehr klar sind.

Zur Titration gelangten stets 20 ccm Auszug, entsprechend einem Gehalt von 2,0 g, bezw. bei voluminösem Material und Safran von 1,0 g Gewürz.

c) Titration nach *Harris,* Vorschläge von *Nink.*

Die Titrationsmethode nach *L. Harris (11)* ist eine Modifikation des *Tillmans'schen* Verfahrens. Die Hauptpunkte, die eine Abänderung bedeuten, sind die, daß *Harris* kalte Auszüge mit 20%iger Trichloressigsäure benutzt und daß er die F.L. vorlegt und dazu den Auszug aus einer Bürette zufließen läßt. *J. Effern (4)* und *K. Enßlin (5)* haben sich eingehend mit der Nachprüfung dieser Vorschläge befaßt. *Enßlin* zieht auf Grund seiner Ueberlegungen und Versuche den Schluß, daß für Extrakte aus tierischen Organen der Methode nach *Harris,* für Pflanzenauszüge jedoch der ursprünglichen nach *Tillmans* der Vorzug zu geben ist. Die *Harris'sche* Methode wurde daher bei der Untersuchung der Gewürze nicht angewandt.

Auch von *H. Nink (3)* liegen zwei Vorschläge vor, die eine Verbesserung der *Tillmans'schen* Titration, angewandt auf ziehendes Material, beabsichtigen. Sie schlägt erstens eine kolori-

metrische Methode vor; diese ergibt jedoch genau wie die Nitrobenzolmethode auch immer nur relative Werte. Zweitens stellte sie Versuche an, den F.L.-Verbrauch so zu bestimmen, daß ein Ueberschuß von F.L. mit Ferroammonsulfatlösung zurücktitriert wird. Aber auch dieser Methode steht das Ausschütteln mit Nitrobenzol gleichwertig gegenüber. Beide Methoden ergeben für stark gefärbte Auszüge sogar eher ungenauere Vergleichswerte als bei der Anwendung von Nitrobenzol.

4. Weitere Titrationsmethoden.

a) Prune.

Nach einer Arbeit von *H. Beier (6)* ist auch der Farbstoff Prune geeignet für die Titration des C-Vitamins. Dieser Farbstoff gehört zu der Gruppe der Oxazine, hat die Summenformel $C_{16}H_{15}N_2O_5Cl$ und das Molekulargewicht 350. Zur Titration wird eine 0,001n Lösung benutzt, dazu werden 0,180 g des gereinigten Farbstoffs eingewogen. Die Lösung wird gegen Titantrichlorid eingestellt. Das Prune ist sehr beständig, es läßt sich längere Zeit mit konzentrierter Salzsäure kochen, ohne zerstört zu werden. Diese Tatsache ist deshalb von Wichtigkeit, weil sie bei der Anwendung des Farbstoffs eine Rolle spielt. *Beier* unterscheidet eine Prune-Reaktion in der Kälte und eine Prune-Reaktion in der Hitze. Ich habe beide Methoden auf die Gewürze angewandt.

Prune-Reaktion in der Kälte.

Die Werte, die man mit Hilfe der Prune-Reaktion in der Kälte erhält, sind nicht quantitativ. Es stellen sich nach ca. 30 Minuten Gleichgewichtswerte ein, die anhand der von *H. Beier (6)* aufgestellten Kurve auf die Dichlorphenol-indophenol-Werte umgerechnet werden müssen. Da eine glatte Titration mit dem Indophenolfarbstoff bei den Gewürzen nicht durchzuführen war und dabei auch nur relative Werte erhalten werden konnten, hatte auch die Prune-kalt-Titration in positivem Sinne keinen Zweck. Allerdings kann man in Fällen, in denen kein Prune-Verbrauch beobachtet wird, stets den Schluß ziehen, daß auch kein Vitamin C vorhanden ist. Nur aus diesem Grunde habe ich diese Titration auf die Gewürze angewandt und damit — besonders bei schwarzem Pfeffer und Majoran — recht interessante Resultate erhalten.

Es sei der Vollkommenheit halber hier noch bemerkt, daß *Beier* ausdrücklich darauf hinweist, daß die Prune-kalt-Titration

nicht anwendbar ist, wenn Tanningerbstoff in dem Auszug zugegen ist.

Ausgeführt habe ich die Prune-kalt-Titration in Anlehnung an die Angaben von *Beier* folgendermaßen: In 2 Erlenmeyerkölbchen gab ich je 20 ccm Auszug, 1 ccm konz. Salzsäure und 10 ccm Prunelösung. In 2 weitere — als Blindversuche — je 20 ccm H_2O_v, 1 ccm konz. Salzsäure und 10 ccm Prunelösung. Einer der Blindversuche wurde sodann nach Zusatz von 2 ccm gesättigter Natriumoxalatlösung mit ca. n/100 Titantrichloridlösung titriert. Die drei anderen Ansätze standen genau 30 Minuten unter Stickstoff, bei den beiden Hauptversuchen wurde danach die unverbrauchte Menge Prune ebenfalls mit Titantrichlorid gemessen, am Schluß des Versuches kam dann noch der zweite Blindansatz zur Titration. Die Titantrichloridlösung läßt man der geringen Mengen wegen am besten aus einer Mikrobürette zufließen.

Prune-Reaktion in der Hitze.

Quantitativ reagiert Prune mit Vitamin C dann, wenn man es kochend einwirken läßt. Hierbei ist die Versuchsanordnung — zwei Ansätze mit Auszug, zwei Blindversuche — die gleiche wie vorher. Es wird genau 1 Minute gekocht, dann setzt man 2 ccm gesättigte Natriumoxalatlösung zu und titriert noch heiß zurück. Allerdings erhält man auf diese Art — wie Beier selbst anführt — nicht immer genaue Werte. Sind z. B. Katechingerbstoffe vorhanden, so wird Prune in großen Mengen reduziert. Es haben sich hier während des Kochens mit Salzsäure durch Hydrolyse bereits in einer Minute Stoffe gebildet, die hohes R.V. zeigen.

Gleichzeitig mit *H. Beier (6)* veröffentlichten *J. Melville* und *G. M. Richardson (13)* eine Arbeit: „Prune als Oxydo-Reduktions-Indikator und seine Eignung zur Ascorbinsäuretitration" mit dem Resultat, daß die Prunetitration in der Hitze — in ähnlicher Weise ausgeführt wie von *Beier* — brauchbar, aber nicht absolut spezifisch ist.

b) *Lauth's* Violett.

H. Beier (6) beschäftigt sich dann weiterhin damit, eine Titrationsmethode für die Ascorbinsäure mit Hilfe von *Lauth's* Violett auszuarbeiten. Da dessen Reduktions-Oxydations-Potential (genau so wie das des Farbstoffs Prune) in nächster Nähe von dem des C-Vitamins liegt, stellt sich auch hier nur ein Gleichgewicht ein. Auch hier wieder sind die Werte nur durch Vergleich mit den

Indophenolwerten brauchbar zu gestalten. Im wesentlichen hat die Titration mit *Lauth's* Violett die gleichen Mängel wie die mit Prune. Zudem ist ihre Ausführung weit umständlicher. Sie unterblieb aus diesen Gründen bei Untersuchung der Gewürze.

c) Jod.

Außer der Titration mit dem Indophenolfarbstoff versuchten *J. Tillmans und Mitarbeiter (12)*, den reduzierenden Stoff in Lebensmitteln durch Titration mit Jod in saurer Lösung zu erfassen. Der Hauptnachteil dabei ist der, daß das Jod infolge seines höheren Potentials in der Oxydationswirkung viel weniger auswählend ist als das 2,6-Dichlorphenol-indophenol. Bei gefärbten Auszügen kann die Methode überhaupt nicht angewandt werden.

d) Die *Clark'schen* Indikatoren.

Unter den *Clark'schen* Indikatoren versteht man Farbstoffe, die von *W. M. Clark und Mitarbeitern (14)* eingehend auf ihre Verwertbarkeit zur kolorimetrischen Messung von Reduktions-Oxydations-Potentialen untersucht worden sind. Es sind dies meist Indophenolfarbstoffe, zu denen auch das 2.6-Dichlorphenol-indophenol gehört. Außer diesem einen Vertreter haben sie für die Ascorbinsäuretitration keine Erfolge gezeigt.

5. Erschöpfende Auszüge.

Extrahiert man ein bestimmtes Material nach der Bearbeitung des ersten Auszugs zum zweiten Mal, so wird man in Fällen, in denen von reduzierenden Körpern nur C-Vitamin ausgezogen worden ist, hierbei nur noch ganz geringes R.V. feststellen können. Bei der dritten Extraktion ist das R.V. dann überhaupt verschwunden. Bilden sich jedoch erst durch Hydrolyse reduzierende Stoffe, so wird, wenn man ein zweites, ein drittes Mal usw. erneut Auszüge macht, immer neues R.V., wenn auch in abnehmendem Maße, entstehen. Hat man diese Tatsache bei irgendeinem Material festgestellt, dann wird man stets sagen können, daß der Hauptanteil des R.V. nicht auf C-Vitamin zurückzuführen ist.

Den „erschöpfenden" Auszug habe ich bei der Untersuchung der Gewürze folgendermaßen ausgeführt: Ich stellte mir einen essigsauren Kochauszug her, wie dies oben (s. S. 5) beschrieben ist, setzte den Rückstand sofort unter Stickstoff und extrahierte ihn dann auf die gleiche Art wie zuvor zum zweiten Mal. In den

meisten Fällen habe ich dann eine dritte Extraktion angeschlossen, bei Thymian wurde insgesamt sechsmal ausgezogen.

6. Zusammenfassung.

Zusammenfassend ist zu sagen: Das R.V. eines Lebensmittels von vollkommen unbekanntem C-Vitamingehalt wird in erster Linie mit Hilfe des kalten Auszugs festgestellt. Zur Titration eignet sich von allen bisher in Vorschlag gebrachten Farbstoffen das 2,6-Dichlorphenol-indophenol am meisten, und zwar so angewandt, daß man zuert auf rot und nach dem Abstumpfen dann auf blau titriert. Bei gefärbten Auszügen ist die Nitrobenzolmethode anzuwenden. Zeigt der kalte Auszug kein R.V., bildet sich aber reduzierender Stoff nach dem Aufkochen, dann ist kein Vitamin C vorhanden. Ist aber im kalten Auszug R.V. gefunden worden, dann sind die Nachweismethoden für das Vitamin C und die Abtrennung der störenden Stoffe anzuwenden, wie dies noch später näher beschrieben wird. Ergeben sich für den kalten Auszug weder sofort noch nach dem Aufkochen Titrationswerte und glaubt man, daraus entnehmen zu können, daß die kalte Extraktion keinen genügenden Anhalt gibt, dann ist eine Weiterarbeit ebenfalls angebracht.

II. Bestimmungsmethoden für Vitamin C.

1. Spontanreduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol.

Kann man einen Auszug mit dem Indophenolfarbstoff glatt auf rot titrieren und wird die Lösung nach Zugabe von Natriumazetat sofort blau, dann liegt praktisch nur Vitamin C vor.

Verschwindet die Farbe nach dem Azetatzusatz und muß man erneut F.L. zusetzen, um eine Blaufärbung zu erreichen, dann kann man in den Fällen, in denen man weiß, daß überwiegend Vitamin C vorhanden ist, auch dann noch den Farbstoffverbrauch bis zur Rotfärbung dafür in Rechnung setzen. Ist aber sehr wenig C-Vitamin vorhanden oder ist über den Gehalt garnichts bekannt, dann darf man nicht ohne weiteres aus der Spontanreduktion auf den C-Vitamingehalt schließen und kann auch nicht den Farbstoffverbrauch bis zur Rotfärbung auf dieses zurückführen. Deshalb konnte der Nachweis von Vitamin C bei den Gewürzen, über deren Gehalt ja noch nichts feststand, auf diese Art nicht erbracht werden. Außerdem waren alle Auszüge so gefärbt, daß eine Spontanentfärbung entweder nicht beobachtet oder aber vorgetäuscht werden konnte.

2. Lufteinwirkung.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß das Vitamin C durch Lufteinwirkung verhältnismäßig leicht zerstört wird. Besonders rasch geht diese Oxydation in alkalischer Lösung vor sich. Man kann dabei in Lösungen, die als reduzierenden Stoff nur Vitamin C enthalten, wohl eine Abnahme beobachten, in Auszügen aber, die noch außerdem Gerbstoffe oder Kohlehydrate enthalten, wird man eine oft recht erhebliche Steigerung des R.V. durch entstandene Spaltprodukte wahrnehmen.

Läßt man schwach saure Lösungen, die Vitamin C enthalten, über Nacht offen an der Luft stehen (bei Zimmertemperatur), so zeigt sich am nächsten Tage ebenfalls Abnahme des R.V. Ich habe diesen Versuch mit den obengenannten Gewürzen in 0.2%ig essigsaurer Lösung durchgeführt und bei allen eine Verminderung — teils geringer, teils stärker — festgestellt, obwohl ich andererseits nachweisen konnte, daß Vitamin C nicht vorhanden war. Demnach kann man die oxydierende Wirkung der Luft weder in alkalischem noch in saurem Medium als Nachweisreaktion benutzen.

3. Haltbarkeit unter Stickstoff.

Unter Stickstoff hält sich das Vitamin C bei Zimmertemperatur längere Zeit fast unverändert. Die Konstanz des R.V. vergrößert sich noch, wenn man die betreffenden Lösungen im Eisschrank aufbewahrt. Bei den Gewürzen prüfte ich die Haltbarkeit des R.V. unter Stickstoff auf zwei Arten nach. Ein Teil des Auszugs wurde nach der ersten Titration acht Stunden bei Zimmertemperatur, ein anderer zwanzig Stunden im Eisschrank unter Stickstoff gehalten. Die für die einzelnen Auszüge gefundenen Werte sind bei den entsprechenden Gewürzen angegeben.

Einen Schluß auf den C-Vitamingehalt aus dem Verhalten bei der Aufbewahrung unter Stickstoff zu ziehen, ist nicht möglich, weil sich viele andere reduzierende Körper ganz ähnlich verhalten wie jenes. Dies konnte ich bei der Bearbeitung der Gewürze feststellen.

4. Prunetitration in der Hitze, qualitativ.

Abgesehen davon, daß man unter Umständen die Prune-heiß-Titration, wie oben angegeben (s. S. 17), zur quantitativen Ascorbinsäurebestimmung benutzen kann, wenn gewisse Stoffe die Reaktion nicht störend beeinflussen, ist auch eine qualitative Anwendung möglich. Nach *H. Beier (6)* ist sie folgendermaßen auszuführ-

ren: In einem Reagenzglas wird der Auszug mit wenig 1 : 5 verdünnter Salzsäure angesäuert und so viele Tropfen Prune zugegeben, daß eine Rotfärbung eben erkennbar ist. Dann wird kurz aufgekocht, bei Anwesenheit von Vitamin C verschwindet die rote Farbe.

Auch diese Reaktion wird selbstverständlich nicht nur vom Vitamin C gegeben, kann jedoch in gleichem Sinne wie das *Bezssonoff'sche* Reagenz angewandt werden (s. S. 1). Hierbei erweist sich Prune sogar als noch spezifischer als dieses.

Da ich Prune-heiß-Titration bei den Gewürzen quantitativ ausführte, erübrigte sich die qualitative Reaktion.

5. Zusatz von Ascorbinsäure.

Setzt man zu einem Auszug, der ein bestimmtes R.V. hat, das nicht auf Vitamin C zurückzuführen ist, eine bekannte Menge einer Ascorbinsäurelösung zu, so erwartet man, daß das Gesamt-R.V. sich nun aus dem ursprünglichen und dem der zugesetzten Ascorbinsäure zusammensetzt. Das ist jedoch nicht immer der Fall. So erhielt ich z. B. bei Safran, bei dem ich den Ascorbinsäurezusatz zum ersten Mal ausgeführt habe, ein wesentlich geringeres Gesamt-R.V. als theoretisch zu erwarten war. Danach war also ein Teil des C-Vitamins durch einen Bestandteil des Auszugs zerstört worden. Die logische Folgerung war die, daß in dem Auszug neben diesem zerstörenden Stoff kein Vitamin C vorhanden sein konnte. Damit hatte ich eine eindeutige Methode gefunden, mit der man das Fehlen von Vitamin C rasch und einwandfrei nachweisen kann. Sie kann naturgemäß nur in negativem Sinne angewandt werden; es ist nicht möglich, Schlüsse zu ziehen, wenn das theoretische Gesamt-R.V. unverändert vorgefunden wird.

Die Ausführung sei an einem Beispiel erläutert:

Lösung I: 35,2 mg Ascorbinsäure werden mit 1 ccm E_{20} und H_2O_v auf 100 ccm aufgefüllt und unter Stickstoff aufbewahrt. Da 0,088 mg 1 ccm F.L. reduzieren, liegt also ein Gesamt-R.V. von 400 ccm F.L. vor.

Lösung II: 100 ccm des zu untersuchenden Auszugs werden mit 1 ccm E_{20} und H_2O_v auf 200 ccm aufgefüllt. Bei der Titration ergibt sich für 20 ccm Lösung ein Verbrauch von 3,2 ccm F.L.

Lösung III: 10 ccm Lösung I werden mit 1,9 ccm E_{20} (alle Lösungen konstant 0,2%ig essigsauer) und H_2O_v auf 200 ccm

aufgefüllt. Die Titration — in diesem Falle auch für die Ascorbinsäure mit Nitrobenzol — ergibt für 20 ccm Lösung einen Verbrauch von 4,0 ccm F.L.

Lösung IV: 100 ccm Auszug + 10 ccm Lösung I (Menge a) + 0,9 ccm E_{20} + H_2O_v auf 200 ccm aufgefüllt. 20 ccm enthalten jetzt R.V. des Auszugs ($R.V._A = 3{,}2$ ccm) und R.V. des zugesetzten C-Vitamins ($R.V._{Va} = 4{,}0$ ccm), sie titrieren also theoretisch 5,2 ccm F.L.

Lösung V: 100 ccm Auszug + 20 ccm Lösung I (Menge 2a) + 0,8 ccm E_{20} + H_2O_v auf 200 ccm aufgefüllt. 20 ccm enthalten jetzt $R.V._A$ 3,2 + $R.V._{V2a}$ 8,0: theoretischer Titrationswert 11,2 ccm F.L.

Lösung VI: Nach Beendigung der Titrationen der Lösungen I bis V wird eine Lösung hergestellt und titriert, die genau der Lösung III entspricht. Stellt man nun die Werte III und VI einander gegenüber, so kann man daraus die Abnahme des R.V. der Ascorbinsäure während der Gesamtbearbeitungszeit ersehen und die bei IV und V erhaltenen Werte danach korrigieren.

Man setzt also in die Berechnung des theoretischen Titrationswertes und des Wertes für die evtl. zerstörte Menge C-Vitamin nicht das R.V. der Lösung III ein, sondern den Wert, der bei dem Zeitpunkt der Ausführung der Ascorbinsäure tatsächlich entsprach. Man findet ihn, an dem obigen Beispiel erläutert, folgendermaßen: Wert III 4,0; Wert VI 3,7. Die dazwischenliegende Zeit sei 3 Stunden. Das Ascorbinsäure-R.V. hat demnach pro Stunde um 0,1 abgenommen. Hat man den Wert IV eine Stunde nach der Feststellung des Wertes III erhalten, so darf man in die Berechnung für C-Vitamin nicht 4,0 einsetzen, sondern 3,9. Der theoretische Gesamtwert ist also bei IV nicht mit 5,2, sondern mit 5,1 in Rechnung zu setzen. — Die Berechnung für die Menge 2a gestaltet sich ganz analog.

Diese Korrekturen wurden in allen Fällen bei der Untersuchung der Gewürze berücksichtigt, wenn sich die Resultate III und VI wesentlich voneinander unterschieden.

Selbstverständlich ist es nicht nötig, außer der Menge a auch noch die Menge 2a an Ascorbinsäure zuzusetzen. Bei den einzelnen Gewürzen verfuhr ich aber nach diesem Schema, um auch gleichzeitig quantitativ näher auf den zerstörenden Stoff einzugehen.

So fand ich, daß die Vitaminzerstörung nach zwei Arten erfolgt. Im einen Falle wird immer eine ganz bestimmte Menge zer-

stört, gleichgültig wieviel man zugesetzt hat — hier ist also die Differenz zwischen dem theoretischen und dem praktischen Titrationswert bei der Menge a genau so groß wie bei der Menge 2a. Im anderen Falle ist die Menge des zerstörten Vitamins umso größer, je mehr Vitamin man zusetzt — hier wächst die Zerstörungskraft proportional der zugesetzten Vitaminmenge. Im Falle 1 liegt also ein Stoff vor, der quantitativ mit Ascorbinsäure reagiert, ist er verbraucht, so findet keine weitere Zerstörung statt. Im Falle 2 dagegen stellt sich ein Gleichgewicht ein.

Es ist nicht empfehlenswert, zu diesem Versuche statt reiner Ascorbinsäure Zitronensaft zu benutzen, da man die Wirkung der darin enthaltenen Zitronensäure und anderer Bestandteile auf den Auszug nicht kennt.

6. Zusammenfassung.

Alle bisher ausgearbeiteten Methoden zum Nachweis oder zur Bestimmung der Ascorbinsäure haben sich für die Untersuchung eines Materials, über dessen Ascorbinsäuregehalt nichts bekannt ist, als nicht einwandfrei erwiesen. Die Spontanreduktion mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol, die Lufteinwirkung, die Haltbarkeit unter Stickstoff, die Prune-heiß-Entfärbung und auch das *Bezssonoff'sche* Reagenz sind zu wenig spezifisch für das Vitamin C. Die Ascorbinsäurezusatz-Methode kann nur dazu benutzt werden, nachzuweisen, daß Ascorbinsäure n i c h t vorhanden ist. Selbstverständlich kann man auch die Prune-heiß-Entfärbung und das *Bezssonoff'sche* Reagenz im Sinne dieser letzteren Methode anwenden und dadurch einwandfrei das Fehlen von Vitamin C feststellen.

III. Abtrennung der störenden Stoffe

Als „störende Stoffe" werden diejenigen Stoffe bezeichnet, welche genau wie die Ascorbinsäure das Dichlorphenol-indophenol reduzieren. Wir haben gesehen, daß die einfache Titration in zwei Stufen (zuerst auf rot, dann auf blau) nur dann anwendbar ist, wenn das Vitamin C in weitaus überwiegender Menge vorhanden ist. Aendert sich aber die Zusammensetzung so, daß die anderen reduzierenden Substanzen im Vordergrunde stehen, oder ist über die Zusammensetzung und über den Ascorbinsäuregehalt nichts bekannt, dann ist eine Abtrennung der störenden Stoffe nötig, wenn man nicht gerade eine Methode hat, die es erlaubt, die störenden Körper neben dem C-Vitamin bestimmen und in Abzug bringen zu können. Soweit man bis heute unterrichtet ist, können

sich folgende Stoffe bei der Titration nach *Tillmans* störend bemerkbar machen:

I. Gerbstoffe der Katechin- und Tanninreihe.
II. Eisen-II-verbindungen.
III. Evtl. aetherische Oele.
IV. Organische Schwefelverbindungen.
V. Spaltprodukte der Kohlehydrate.

1. Gerbstoffe der Katechin- und Tanninreihe.

a) Formaldehyd-Salzsäure-Fällung.

Durch die Behandlung eines Auszugs mit Formaldehyd-Salzsäure fallen die Katechingerbstoffe vollkommen aus. Die Gallotannine bleiben ganz oder teilweise in Lösung. Ist Ascorbinsäure vorhanden, so müßte sie zusammen mit den Gallotanninen im Filtrat der Fällung zu finden sein.

Nach *K. Freudenberg (15)* ist diese Fällung so auszuführen, daß man mit Formaldehyd und Salzsäure 30 Minuten kocht. Nun wird aber bei dieser Behandlung die Ascorbinsäure zerstört. *H. Beier (6)* wies diese Zerstörung mit Zitronensaft nach, ich selbst habe den Versuch mit reiner Ascorbinsäure wiederholt und nach 30 Minuten Kochzeit kein R.V. mehr gefunden. Beier schlägt deshalb die Anwendung von Formalin in der Kälte vor. Auch hierbei geben die Katechingerbstoffe schon einen Niederschlag. Ein zerstörender Einfluß auf das C-Vitamin ist bei dieser Behandlung kaum zu bemerken. (Wenn hier von Zerstörung des Vitamins die Rede ist, dann soll dies nur die Tatsache charakterisieren, daß sein R.V. verloren geht.)

Formaldehyd-Salzsäure in der Hitze.

Behandelt man einen Auszug kochend mit Formaldehyd-Salzsäure, so kann sich das R.V. nach dieser Behandlung dann unverändert vorfinden, wenn an dem Anfangs-R.V. Vitamin C nicht beteiligt ist und keine Katechingerbstoffe vorhanden sind. Dies ist eine Methode, das Fehlen von C-Vitamin bei gleichzeitiger Abwesenheit von Katechingerbstoffen feststellen zu können. Nun kann man einwenden, daß in einem solchen Falle einerseits das R. V. durch Vitaminzerstörung gefallen, andererseits durch Hydrolyse (Kochen mit Salzsäure) gestiegen ist und daß man dann trotz dieser Veränderung das gleiche R.V. wiederfinden kann. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß es ein großer Zufall wäre, wenn sich die Abnahme und die Zunahme gerade so ausgeglichen hätten, daß schließlich genau das gleiche R.V. wieder vorhanden ist. Mei-

stens wird beim Kochen mit Formaldehyd-Salzsäure die Einwirkung des Formaldehyds vorherrschen. Tritt aber die Hydrolysenwirkung in den Vordergrund, dann wird man gewöhnlich zum Schluß Werte erhalten, welche die Anfangswerte noch übertreffen.

100 ccm Auszug versetzte ich (in Anlehnung an die Angaben *Freudenbergs)* mit 5 ccm konz. Salzsäure und 10 ccm 40%iger Formalinlösung. Nach einer Kochzeit von 30 Minuten am Rückflußkühler und Abkühlen unter Stickstoff in Eis zentrifugierte ich den entstandenen Niederschlag und füllte die klare Lösung in einen 200 ccm-Meßkolben. Dann gab ich unter dauerndem Umschütteln so viel 2n-Natronlauge aus einer Bürette zu, wie zur Neutralisation der Salzsäure nötig war und füllte mit 1 ccm E_{20} und H_2O_v bis zur Marke auf. Die nötige Menge Natronlauge stellte ich dadurch fest, daß ich 2 ccm der angewandten konz. Salzsäure vor jeder Fällung mit 2n-Natronlauge titrierte und auf 5 ccm umrechnete. Die F.L. erwies sich gegen Formaldehyd indifferent. Ein Blindversuch — Titration einer genau so behandelten Formaldehyd-Salzsäure-Lösung ohne Auszug — bewies mir das. Auch *K. Trillhose (9)* hatte schon festgestellt, daß der Farbstoff innerhalb 24 Stunden weder von Formaldehyd noch von Acetaldehyd angegriffen wird.

Formaldehyd-Salzsäure in der Kälte.

Es ist nicht anzunehmen, daß sich die Fällung in der Kälte, wie sie *H. Beier (6)* vorschlägt, genau so quantitativ gestaltet wie beim Kochen, da man auch die Einwirkungszeit nicht zu lange ausdehnen darf, weil sonst das Vitamin C merklich angegriffen wird. Wenn ich die Methode bei der Untersuchung der Gewürze angewandt habe, so ist der Grund nur darin zu suchen, daß eine Gegenüberstellung zu den Kochwerten interessant erschien, im allgemeinen jedoch ist sie wenig empfehlenswert.

Die Ausführung gestaltet sich völlig analog dem Kochversuch, nur läßt man den Ansatz, anstatt ihn zu kochen, 15 Minuten unter Stickstoff bei Zimmertemperatur stehen.

In beiden Fällen (heiß und kalt) ist wohlgemerkt nur eine Trennung von den Katechingerbstoffen erreicht. Man wird also im Filtrat neben Vitamin C immer noch die Gallotanningerbstoffe miterfassen.

b) Essigsäure-Bleiazetat-Fällung.

Um die Gerbstoffe der Gallotanningruppe von dem Vitamin

C abzutrennen, wird die Fällung mit Bleiazetat in essigsaurer Lösung vorgenommen. Die Lösung muß dabei einen ganz bestimmten Gehalt an Essigsäure haben. Ist sie zu stark essigsauer, dann ist die Abscheidung des Gerbstoffs nicht genügend quantitativ, ist sie zu schwach sauer, dann fällt das Bleisalz der Ascorbinsäure aus. Als Resultat verschiedener Versuche ergab sich als günstigste Bedingung ein 2%ig essigsaures Medium. Allerdings kann bei dieser Fällung nicht vermieden werden, daß ein geringer Prozentsatz Vitamin C von dem ausfallenden voluminösen Gerbstoff mitgerissen wird.

Ich setzte zur Ausführung der Bleifällung im 200 ccm-Meßkolben zu 100 ccm Auszug zuerst 19 ccm E_{20} zu, dann füllte ich mit Bleiazetatlösung bis zur Marke auf. Nach zwei- bis dreimaligem Umschütteln ließ ich unter Stickstoff ½ Stunde stehen, zentrifugierte den Niederschlag ab und titrierte. Im allgemeinen kamen, wie bereits erwähnt, nur 0,2%ig essigsaure Lösungen zur Titration. Ich konnte aber in dem vorliegenden Falle ohne Bedenken den nach der Titration in 2,0%ig essigsaurer Lösung gefundenen Wert dem gegenüberstellen, den ich bei der Titration des ursprünglichen Auszugs in 0,2%ig essigsaurer Lösung erhalten hatte. Ich stellte nämlich bei allen Gewürzen Blindversuche in der Richtung an, daß ich einmal einen Teil des Auszugs 0,2%ig ließ und titrierte, einen anderen Teil aber erst dann zur Titration brachte, nachdem ich den Essigsäuregehalt auf 2,0% erhöht hatte. Unterschiede zwischen den Parallelwerten waren nirgends festzustellen.

Ob die zugesetzte Menge Bleiazetat (ca. 80 ccm) zur vollkommenen Fällung ausreichend war, prüfte ich dadurch, daß ich vor dem Zentrifugieren noch einige Tropfen zusetzte und feststellte, ob sich dadurch in der überstehenden, klaren Flüssigkeit Trübung oder Ausflockung zeigte. Dies wurde jedoch in keinem Falle beobachtet. Ein Ueberschuß an Bleiazetat hatte keine nachteilige Wirkung.

Man titriert hier im Filtrat außer dem Vitamin C die nichtausgefällten Katechingerbstoffe. Es ist jedoch nicht möglich, nun mittels einfacher mathematischer Rechnung aus den drei Größen: Gesamt-R.V., R.V. nach der Formaldehydfällung, R.V. nach der Bleifällung den Reduktionsanteil des C-Vitamins zu bestimmen. Erstens können die Gallotannine nach *K. Freudenberg (15)* bei der Formaldehyd-Salzsäurebehandlung teilweise mitausgefällt werden. Bei den gefundenen Werten fehlt deshalb ein Teil des R.V., sie setzen sich also nicht quantitativ aus Vitamin C und Gallotannin zusammen. Zweitens ist auch ein geringes Ausfallen des

C-Vitamins bei der Bleifällung erwiesen, der Wert des Filtrats ist also kleiner als der erwartete für Vitamin C + Katechingerbstoff. Und drittens sind meist noch andere störende Stoffe vorhanden, die sich teils hier, teils dort im R.V. wiederfinden.

c) Aussalzen, weitere Methoden.

Auch die Versuche von *H. Beier (6),* die Gerbstoffe, die in den Auszügen oft kolloidal gelöst sind, mit Natriumchlorid auszusalzen, zeigten keine großen Erfolge. *Beier* wandte diese Methode, um sie auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen, auf Lösungen an, die nur aus Vitamin C und einem Gerbstoff zusammengemischt waren. Dabei waren die Ergebnisse in einigen Fällen gut, der Gerbstoff war ausgeschieden und die Ascorbinsäure fand sich nach dem Aussalzen fast unverändert wieder. Bei den meisten Versuchen aber waren sie wenig quantitativ, bei einigen wurden Ausflockungen überhaupt nicht erhalten. Die Katechingerbstoffe fallen nicht aus. Eine Anwendung der Methode auf die Gewürze zeigte, daß man auf ihre Resultate in keinem Falle irgendwelche quantitative Berechnungen aufbauen kann. Sie kommt höchstens in ergänzendem Sinne in Frage, und zwar nur qualitativ.

Das Aussalzen führte ich folgendermaßen durch: Zu 100 ccm des zu untersuchenden Auszugs setzte ich so viel Natriumchlorid zu, als zur Sättigung nötig war, bis also Natriumchlorid als Bodenkörper erschien. Dann ließ ich den Ansatz unter Stickstoff ½ Stunde stehen, schüttelte aber ca. alle 5 Minuten kräftig durch. Nach dem Zentrifugieren füllte ich die klare Lösung in einen 200 ccm-Meßkolben und füllte mit 1 ccm E_{20} und H_2O_v bis zur Marke auf. Dann kamen je 20 ccm zur Titration.

Nicht nur das Aussalzen, auch die nach verschiedenen Richtungen hin angestellten Adsorptionsversuche mit Hautpulver, Fasertonerde und Tierkohle ergaben durchaus unregelmäßige Resultate. Ebensowenig konnte eine Abtrennung der Ascorbinsäure von den Gerbstoffen durch Kollodium- und Kieselgurfilter oder durch Dialyse und Elektrodialyse erreicht werden. Auch Versuche, die Katechine mit Metallsalzen zu fällen, schlugen fehl. Eine Abtrennung der Katechingerbstoffe durch Behandlung mit Brom wurde von *J. Effern (4)* durchgeführt. Da einerseits aber geringe Mengen Brom auf die F.L. zerstörend einwirken, andererseits das Brom nur sehr umständlich vollkommen zu entfernen ist, muß man der Formaldehydmethode den Vorzug geben.

2. Eisen-II-verbindungen.

Es ist bekannt, daß Eisen in verschiedenen Pflanzen natürlich vorkommt. Da es feststeht, daß Eisen-II dann, wenn es als Oxalatkomplex vorliegt, mit Dichlorphenol-indophenol glatt reagiert — wovon ja auch bei der Einstellung der F.L. Gebrauch gemacht wird — glaubte man, annehmen zu müssen, daß ein natürlicher Eisen-II-gehalt sich bei der Titration störend auswirkt. Zudem hielt man es für wahrscheinlich, daß es sich in Form anderer Komplexe ähnlich verhält.

In der Titration mit Methylenblau ohne irgendwelche vorhergehende Abtrennung glaubte *H. Beier (6)* eine Methode gefunden zu haben, die eine einfache quantitative Bestimmung des Ferroeisens neben Vitamin C gestattete. Mit letzterem reagiert Methylenblau nicht, oder besser gesagt, unendlich langsam, da die Normalpotentiale dieser beiden Stoffe nahe beieinander liegen.

Bei der Titration von verschiedenen frischen Gemüsen, deren Asche einen verhältnismäßig hohen Eisengehalt aufwies, konnte von *J. Tillmans und Mitarbeitern (16)* festgestellt werden, daß das natürlich vorkommende Eisen die Titration mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol nicht störend beeinflußt. Wohl aber ist ein Eisen-II-gehalt dann von Bedeutung, wenn Eisen auf künstlichem Wege — wenn auch unbeabsichtigt — dem betreffenden pflanzlichen Lebensmittel beigemengt ist. In dieser Form wirkt das Eisen auf den Indophenolfarbstoff reduzierend ein. Dieser Fall liegt z. B. bei Konserven vor und außerdem immer dann, wenn die Zerkleinerung des Materials mit Eisengeräten vorgenommen wurde.

Bei der Untersuchung der Gewürze hat sich gezeigt, daß auch die Methylenblautitration wenig spezifisch ist und nicht nur von Eisen-II gegeben wird. Ich habe z. B. bei Safran gegenüber Methylenblau ein R.V. beobachtet, obwohl ich qualitativ Eisen in keiner Form vorfand. Es ist ja auch einleuchtend, daß das Methylenblau nicht nur gerade das Ferroeisen, sondern alle die Stoffe erfassen muß, die ein tieferes Potential haben als das C-Vitamin.

Methylenblaulösung: 0,2 g Methylenblau I ad Höchst werden mit 1 ccm konz. Salzsäure und H_2O_v auf 1000 aufgefüllt und diese ca. n/1000 Lösung (Aequivalentgewicht 186,5) unter Stickstoff aufbewahrt. Die Einstellung geschieht mit Titantrichloridlösung, die ihrerseits gegen n/100 Ferrialaunlösung eingestellt wird.

Methylenblautitration: 20 ccm des Auszugs, der ja bereits durch die Art der Herstellung luftfrei ist, werden mit 4 ccm 1 : 3 verdünnter Schwefelsäure angesäuert und unter Stickstoffdurch-

leiten mit 0,5 ccm Methylenblau deutlich blaugrün gefärbt. Nun wirft man festes Natriumoxalat in kleinen Portionen in den Titrationskolben und bringt durch Umschütteln in Lösung. Ist reduzierendes Eisen vorhanden, so tritt spontan Entfärbung ein. In diesem Augenblick beginnt man mit der eigentlichen Titration. Der Endpunkt zeigt sich durch grünliche Färbung an und ist sehr eindeutig; es ergeben sich hierbei für Ferroeisen dieselben Werte wie bei der Titration nach *Tillmans*.

Was die Versuche von *J. Effern (4)* anbelangt, eine Trennung durch Kohleadsorption zu erreichen, so ist hier folgendes anzuführen: Es liegen zwar verhältnismäßig gute Ergebnisse vor, aber nur dann, wenn die für die zu untersuchende Lösung in Frage kommenden Komponenten nur C-Vitamin und Eisen sind. Ganz ähnlich verhält es sich mit der von Effern erwähnten kolorimetrischen Methode.

3. Wasserdampfdestillation.

In der Wasserdampfdestillation hat man ein weiteres Mittel in der Hand, bestimmte störende Stoffe von dem Vitamin C abzutrennen. Es sind dies die aetherischen Oele und die organischen Schwefelverbindungen. Zwar wurden von verschiedener Seite, u. a. auch von *H. Nink (3)*, eine ganze Reihe aetherischer Oele auf R.V. untersucht und bei keinem eine Einwirkung auf die F.L. beobachtet, es wäre jedoch bei der Vielzahl dieser Stoffe nicht ausgeschlossen, daß trotzdem einer oder der andere R.V. zeigt. Ich konnte allerdings ergänzend feststellen, daß auch keines der aetherischen Oele in den von mir untersuchten Gewürzen R.V. aufwies.

Gleichzeitig mit den aetherischen Oelen gehen bei der Wasserdampfdestillation die organischen Schwefelverbindungen mit über, allerdings nicht quantitativ. Findet man im Destillat kein R.V, so sind keine reduzierenden organischen Schwefelverbindungen vorhanden und die betreffenden aetherischen Oele stören die Titration nicht.

Ich führte die Wasserdampfdestillation so aus, daß ich in der üblichen Apparatur 20 g bezw. 10 g Material 30 Minuten mit Wasserdampf behandelte. In dieser Zeit gingen ca. 180 ccm Flüssigkeit über, die ich in einem 200 ccm-Meßkolben auffing. Nach Auffüllen mit 2 ccm E_{20} und H_2O_v titrierte ich das Destillat und zwar einen Teil mit und einen Teil ohne Nitrobenzol.

Der Rückstand der Wasserdampfdestillation im Destillierkolben wurde als wässeriger Kochauszug betrachtet. Nach Beendigung

der Destillation schüttete ich die Flüssigkeit über dem Rückstand, also das Extrakt, durch Gaze in einen 200 ccm-Meßkolben, gab 2 ccm E_{20} und H_2O_v zu und titrierte wie bisher.

Ergibt sich im Destillat der Wasserdampfdestillation ein R. V., so ist eine quantitative Abtrennung der organischen Schwefelverbindungen nach *J. Effern (4)* durch Vakuumdestillation möglich.

IV. Qualitative Nachweismethoden für die störenden Stoffe.

Um einen ungefähren Anhaltspunkt zu erhalten, welche reduzierenden Stoffe noch neben Vitamin C vorhanden sein könnten, führte ich mit den Auszügen der einzelnen Gewürze noch die bekannten qualitativen Untersuchungen aus.

An Gerbstoffreaktionen kam dabei vor allem die Prüfung mit Eisen-III-salz in Frage. Ich gab 1%ige Eisenalaunlösung tropfenweise zu dem Auszug, den ich vorher neutralisiert hatte. Die Katechingerbstoffe geben grüne, die Gallotannine blauviolette Färbungen. Bromwasser, als zweites Reagenz, bewirkt bei Katechingerbstoffen sofort Fällungen. Zu dem schwach essigsauren Auszug fügt man tropfenweise starkes Bromwasser, bis die Flüssigkeit deutlich danach riecht. Ein erst nach längerem Stehen auftretender Niederschlag soll nicht beachtet werden. Weiterhin kam die Probe mit basischem Bleiazetat in Anwendung. Hiermit fallen sämtliche Gerbstoffe aus. Die Fällungen mit neutralem Bleiazetat (in essigsaurer Lösung), mit Formaldehyd-Salzsäure und mit Natriumchlorid als qualitative Nachweisreaktionen erübrigten sich, da sie quantitativ Anwendung fanden.

Auf Eisengehalt prüfte ich, indem ich den zuerst neutralisierten Auszug mit einigen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd kurz aufkochte und dann Ammoniumrhodanid zusetzte.

Ob reduzierende aetherische Oele oder organische Schwefelverbindungen vorhanden sind, stellt sich bei der Titration des Destillates der Wasserdampfdestillation heraus.

Die Spaltprodukte der Kohlehydrate werden zusammen mit denen der Gerbstoffe in dem nächsten Abschnitt besprochen.

V. Störende Spaltprodukte.

Um welche chemischen Körper es sich handelt, die, meist unter dem Einfluß von Wärme und Mineralsäure, störende reduzierende Produkte bilden, kann nur vermutet werden. Die Arbeiten von *H. Beier (6)* und *J. Effern (4)* z. B. haben gezeigt, daß

aus manchen Gerbstoffen und auch aus Derivaten der Kohlehydrate durch Einwirkung der beiden genannten Agenzien reduzierende Körper gebildet werden können, die Dichlorphenol-indophenol, teilweise sogar spontan, in großen Mengen reduzieren. Ich selbst habe feststellen können, daß das R.V. einer Tanninlösung beim Kochen stark ansteigt. Nach einer Kochzeit von 160 Minuten war das anfängliche R.V. von 16 auf 115 angestiegen. Der Gerbstoff Myrobalanen zeigte beim Kochen in der gleichen Zeit einen Anstieg von 20 auf 125. Die beiden Gerbstoffe Catechu Gambir und Sumach (Extrakt) behielten dagegen ihr R.V. bei der Kochbehandlung unverändert bei. Die Lösungen der vier vorgenannten Gerbstoffe waren mit Natriumazetat auf $p_H = 6{,}8$ gebracht worden, bevor sie gekocht wurden.

1. Hydrolysezahl.

Die von *H. Beier (6)* eingeführte Hydrolysezahl, die er abgekürzt mit HZ bezeichnet, ergibt sich dadurch, daß man den R. V.-Wert des essigsauren Kochauszugs dem gegenüberstellt, den man erhält, wenn man diesen Auszug 1%ig salzsauer kocht. Dann ist:

$$HZ = \frac{\text{R.V., gefunden nach der Salzsäurebehandlung}}{\text{R.V. des essigsauren Kochauszugs.}}$$

Für Vitamin C ist HZ = 1. (Fehler bis $\pm$ 0,5 kommen vor.) Ist die gefundene HZ wesentlich größer als 1, dann sind störende Spaltprodukte gebildet worden. Sie kann aber auch kleiner sein als 1, dann hat die Salzsäure auf den reduzierenden Körper so eingewirkt, daß sein R.V. teilweise (z. B. Thymian) oder ganz (z. B. Majoran) verlorengegangen ist. Allerdings ist mit diesen Feststellungen die Bedeutung der HZ erschöpft, es ist nicht möglich, irgendwelche weiteren Schlüsse aus ihr zu ziehen.

Zur praktischen Durchführung: Ich stellte mir zuerst einen essigsauren Kochauszug her, verdünnte 100 ccm wie bisher auf das Doppelte und titrierte. Gleichzeitig kochte ich weitere 100 ccm mit 15 ccm 2n-Salzsäure genau 30 Minuten am Rückflußkühler; die Menge der zugegebenen Salzsäure war so berechnet, daß die Lösung 1%ig salzsauer war. Ich brachte sie dann in einen 200 ccm-Meßkolben, neutralisierte die Salzsäure durch Zugeben von 15 ccm 2n-Natronlauge, nachdem in Eis unter Stickstoff abgekühlt worden war, fügte 1 ccm E_{20} dazu und füllte mit H_2O_v auf. Dann titrierte ich mit Nitrobenzol. — In zwei Fällen habe ich Hydrolysezahlen erhalten (1,3 und 1,4), die denen der Ascorbinsäure

völlig gleich waren, obwohl diese nicht nachzuweisen war. (Für die Ascorbinsäure muß man bei Berücksichtigung der oben angegebenen Fehlergrenze für HZ die Werte 0,5 bis 1,5 annehmen.) In einem anderen Falle ist die HZ kleiner als 1, und zwar 0,6. Auch hier enthielt das untersuchte Gewürz trotz der Uebereinstimmung kein Vitamin C.

Der praktische Wert der Hydrolysezahl für die zu leistende Aufklärungsarbeit ist also von Fall zu Fall sehr unterschiedlich.

2. Behandlung der kalten Auszüge.

Wie oben (s. S. 5) bereits erwähnt, hat *K. Enßlin (5)* mit Erfolg den kalten Auszug mit anschließendem Kochen dazu benutzt, nachzuweisen, daß sich reduzierende Körper durch Kochhydrolyse bilden. Ich habe bei allen Gewürzen stets zwei Versuchsreihen durchgearbeitet, einmal ausgehend von dem kalten wässerigen, einmal von dem kalten essigsauren Auszug. (Wie diese Auszüge hergestellt wurden, ist bereits weiter oben (s. S. 7) beschrieben worden.) Die einzelnen Stufen bei der Weiterarbeit sind folgende:

Kalter wässeriger Auszug:

1. Anfangstitration nach Ansäuern (0,2%ig essigsauer).
2. Kochen ohne Zusatz, Titration.
3. Kochen 0,2%ig essigsauer, Titration.
4. Kochen 1%ig salzsauer, Titration.

Kalter essigsaurer Auszug:

1. Anfangstitration (0,2%ig essigsauer).
2. Kochen ohne Zusatz (also 0,2%ig essigsauer), Titration.
3. Kochen 1%ig salzsauer, Titration.

3. Verdünnungskurve.

Dem Kapitel „Hydrolyse" konnte ich eine neue Tatsache hinzufügen, die bisher noch bei keinem der untersuchten Lebensmittel beobachtet worden war. Ich stellte bei Safran fest, daß sich das R.V. sofort dann änderte, wenn ich eine Verdünnung des Auszugs vornahm. Titrierte ich einmal 20 ccm, die 1,0 g Safran entsprachen, ein andermal 20 ccm, die 0,5 g entsprachen, dann verhielten sich die Titrationswerte nicht wie 2 : 1, sondern etwa wie 2 : 1,4. Das auf 10 g Gewürz berechnete R.V. war also nicht in beiden Fällen gleich, es war bei der konzentrierteren Lösung kleiner als bei der verdünnteren. Ich habe dann Titrationen von Safranauszügen mit verschiedenem Gehalt durchgeführt und die erhaltenen Werte zu einem Kurvenbild zusammengefügt. Dabei benutzte ich als Abszisse die angewandte Menge Safran in 20 ccm

Auszug und als Ordinate das für 10 g errechnete R.V. Es ergab sich eine logarithmische Kurve. Bei allen anderen Gewürzen zeigte sich das Kurvenbild als eine Gerade, die Titrationswerte stiegen parallel der wachsenden Konzentration. Auch die Ascorbinsäure ändert durch Verdünnung ihr R.V. nicht.

4. Qualitativer Nachweis.

Da die störenden Spaltprodukte sowohl bei Gerbstoffen als auch bei Kohlehydraten auftreten können, wäre noch etwas darüber zu sagen, ob es sich um die eine oder andere Stoffklasse handelt. In allen Fällen, in denen man schon qualitativ nachweisen konnte, daß Gerbstoffe nicht vorhanden sind, ist der Reduktionsanteil der Spaltprodukte auf Kohlehydrate zurückzuführen. Wendet man die üblichen qualitativen Nachweisreaktionen auf Kohlehydrate an, dann darf man nicht vergessen, daß sie auch von der Ascorbinsäure gegeben werden. Auf Kohlehydratvorkommen darf man dabei also nur dann schließen, wenn Ascorbinsäure nicht vorhanden ist. Meist ist der Gehalt an Kohlehydraten in der Literatur zu finden, sodaß sich der qualitative Nachweis derselben erübrigt.

B. Spezieller Teil.

Im folgenden werden die hier angegebenen Abkürzungen benutzt:

R.V. Reduktionsvermögen.
$R.V._a$ Anfangs-R.V.
$R.V._e$ End-R.V., R.V. nach einer Bearbeitung des Auszugs.
$R.V._E$ R.V. des essigsauren Kochauszugs.
$R.V._{HCl}$ R.V. nach Kochen mit HCl.

Bei den R.V.-Werten ist die genaue Kennzeichnung ccm n/1000 Farbstofflösung im Text meist weggelassen.

Die in dem Abschnitt „Allgemeines" angegebenen Daten sind folgenden Werken entnommen:

R. Wasicky, Physiopharmakognosie, 1932,
H. Röttger, Nahrungsmittelchemie, 1926,
Handbuch der Lebensmittelchemie, 1934, Herausgeber: *A. Bömer, A. Juckenack, J. Tillmans.*

Daran schließt sich ein Abschnitt an, der kurze Angaben über die Art des behandelten Materials macht.

Als weitere Abschnitte folgen dann die einzelnen Behandlungen, die sich für die Untersuchung der Gewürze durch die im Kapitel „Allgemeiner Teil" angestellten Ueberlegungen als nötig erwiesen haben.

Zuletzt werden die Ergebnisse dieser Einzeluntersuchungen zusammengefaßt und daraus der Schluß auf den C-Vitamingehalt gezogen. Außerdem wird, soweit dies möglich ist, aufgeklärt, welche Körperklasse das R.V. hervorruft.

1. Safran.

Allgemeines: Unter Safran versteht man die getrockneten Narben von Crocus sativus L. (Familie der Iridiaceen). An für die vorliegende Arbeit interessierenden Komponenten sind zu nennen: ca. 12% Wasser, ca. 1% aetherisches Oel, 6% Pektin, 5.2% Pentosane. Außerdem ist ein Bitterstoff, das Picrocrocin, vorhanden und der Safranfarbstoff, das Crocin. Das Picrocrocin zerfällt beim Behandeln mit Säuren oder Alkalien in Glucose und Safranal. Letzteres ist ein aetherisches Oel, dem Eucarvon isomer. Das Crocin wird durch Säure oder Alkali in die aliphatische Dicarbonsäure Crocetin und das Disaccharid Gentiobiose zerlegt. Gentiobiose gibt bei der weiteren Hydrolyse 2 Moleküle Glucose. Eingehende Forschungen über Crocin, Crocetin und Picrocrocin liegen vor von *Kuhn und Winterstein (17).*

Material: Zur Untersuchung kam elegierter, spanischer Safran. Das Material konnte unzerkleinert zu den einzelnen Extraktionen benutzt werden. Die Auszüge entsprachen bei der Titration einem Safrangehalt von 5%.

Kalter Auszug:	mit Wasser:	mit Essigsäure:
R.V. nach 20 Stunden	7	7
R.V. nach Aufkochen	30	—
Durch Essigsäure-Hydrolyse	40	40
Durch Salzsäure-Hydrolyse	50	50

Der kalte wässerige Auszug ist schwach eigensauer, $p_H = 5{,}4$. — Beim Kochen mit Salzsäure tritt starke Trübung auf (Spaltung des Crocins), wird dann zur Neutralisation der Salzsäure Natronlauge zugegeben, dann findet Ausflockung statt. Daher zentrifugierte ich vor der Titration und erhielt dadurch eine klare, schwachgelbliche Lösung. — Die Titrationswerte der verschiedenen kalten Safranauszüge in unterschiedlichen Zeiten wichen nicht wesentlich voneinander ab (Werte von 4 — 8).

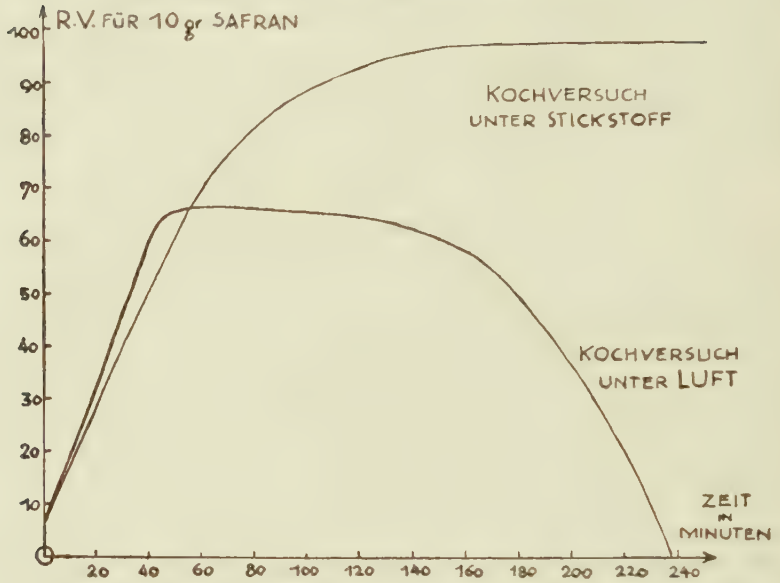
Essigsaurer Kochauszug: Das R.V. = 40 ist bei vollkommen gleichmäßiger Arbeitsweise gut reproduzierbar. Die Titration nach *Tillmans-Siebert* ergab keine Schwierigkeiten. Die austitrierten Lösungen trübten sich stark. — Bei der Titration auf blau war R.V. = 120. — Den Rückstand des essigsauren Kochauszugs behandelte ich zum zweiten und dann zum dritten Mal ebenso mit kochender Essigsäure: $R.V._2 = 31$; $R.V._3 = 30$.

Lufteinwirkung und Haltbarkeit unter Stickstoff: In n/10-alkalischer Lösung war das R.V., nachdem bei 70° eine Stunde lang Luft durchgeleitet worden war, auf das Dreifache gestiegen. Luftdurchleiten bei Zimmertemperatur in gleicher Lösung 4 Stunden lang erhöhte das R.V. auf das Vierfache. — Außerdem führte ich noch einen Versuch durch, der guten Aufschluß über die Einwirkung der Luft auf den kochenden Auszug gab. Ich kochte einen mit Natriumazetat auf $p_H = 6{,}8$ gebrachten Auszug unter dauerndem Luftdurchleiten 3 Stunden am Rückflußkühler und entnahm in Zeitabständen von je 20 Minuten die zu einer Titration nötige Menge Extrakt. Die bei den einzelnen Titrationen erhaltenen Werte ergeben zusammen mit den dazugehörigen Kochzeiten eine Kurve. Die Kochzeiten dienen als Abszisse, die Werte für das dazu errechnete R.V. als Ordinate. Parallel damit führte ich den gleichen Versuch unter Durchleiten von Stickstoff aus. Da der bei diesen Versuchen als Anfangs-R.V. angesetzte Wert erst durch 30 Minuten langes Kochen erhalten worden war, verschieben sich alle Kochzeiten um 30 Minuten. Als Anfangspunkt für das R.V. hat der Wert zu gelten, der bei der Titration des kalten Auszugs gefunden wurde (R.V. = 7), bei dem also die Kochzeit 0 ist. Als nächster Kurvenpunkt folgt dann der mit der Kochzeit 30 Minuten und dem R.V. = 40, daran schließen sich die Kochzeiten des vorbeschriebenen Versuchs mit ihren Titrationswerten an.

In der folgenden Tabelle sind die für diese Kochversuche gefundenen Werte wiedergegeben:

Kochzeit:	R.V. unter Luft:	R.V. unter N:	Kochzeit:	R.V. unter Luft:	R.V. unter N:
0	7	7	130	65	97
30	40	40	150	63	98
50	66	64	170	57	98
70	68	78	190	44	100
90	67	85	210	31	100
110	66	91			

Aus diesen Werten ergeben sich zwei Kurven:



Die Kurve des Luft-Kochversuches zeigt nach dem gleichmäßigen, starken Anstieg durch Hydrolyse zuerst ein langsames, dann ein immer rascheres Abfallen des R.V. Der reduzierende Körper wird also durch Luft zerstört. Die Kurve des Stickstoff-Kochversuches zeigt zuerst den gleichen Anstieg, steigt dann aber weiter und bleibt schließlich lange Zeit konstant auf der gleichen Höhe. Daß die Kurve unter Luft nicht dieselbe Höhe erreicht wie die unter Stickstoff, besagt, daß die den reduzierenden Körper zerstörende Lufteinwirkung schon sehr bald eintritt. Anfangs herrscht dabei noch die Hydrolysenwirkung vor, aber sehr bald tritt die Lufteinwirkung in den Vordergrund.

Daß man es bei einem so klaren Bild von Hydrolysenwirkung nicht mit Vitamin C zu tun hat, liegt auf der Hand. Jedoch ist das vollkommene Fehlen desselben dadurch nicht bewiesen, es ist noch zu berücksichtigen, daß im kalten Auszug bereits R.V. gefunden wurde, über dessen Entstehen noch nichts bekannt ist.

Des Vergleichs wegen führte ich diese beiden Kochversuche auch mit Zitronensaft durch. Ich brachte den mit Wasser verdünnten Saft auf $p_H = 6{,}7$ (er war also wie der Safranauszug fast

neutral) und titrierte nach je 40 Minuten Kochzeit. In beiden Fällen ging ich von dem Titrationswert 1,7 aus. Unter Stickstoff fiel er gleichmäßig pro Titration um 0,4, nach 160 Minuten betrug er also nur noch 0,1. Bei 170 Minuten war demnach das R.V. = 0, es war in neutraler Lösung selbst unter Stickstoff innerhalb 3 Stunden verschwunden. Unter Luft ging das R.V. genau doppelt so rasch zurück, nach 40 Minuten erhielt ich 0,9, nach 80 Minuten 0,1. Hier war also bereits nach 85 Minuten kein R.V. mehr vorhanden. Die Kurven für Zitronensaft sind natürlich gerade Linien.

Stellt man nun die beiden Kurven gegenüber, die sich beim Durchleiten von Stickstoff ergeben, so kommt man zu folgendem Schluß: Wären im Safran größere Mengen Vitamin C enthalten, so müßte sein Kurvenbild unter Stickstoff folgendermaßen aussehen: Das Abnehmen des C-Vitamins wäre zuerst überdeckt durch das durch die Hydrolyse bewirkte Ansteigen. Die Kurve müßte aber dann — analog Zitronensaft unter Stickstoff — wieder abfallen, wenn auch nicht so stark wie unter Luft. Daß sich aber ein konstanter Wert einstellt, ist ein Beweis dafür, daß nennenswerte Mengen Vitamin C nicht vorhanden sein können.

Prune: Die Titration mit Prune ergab kochend das verhältnismäßig hohe R.V. von 130 ccm n/1000 Lösung für 10 g Gewürz. Auch kalt war ein Farbstoffverbrauch festzustellen, hier war R.V. = 44.

Ascorbinsäurezusatz:	Menge a	Menge 2a
R.V.-Anteil des Auszugs	5,6	5,6
R.V.-Anteil der zugesetzten Ascorbinsäure	5,8	11,6
Theoretischer Wert für 20 ccm Mischung	11,4	17,2
Praktischer Titrationswert	8,0	13,7
Differenz, zerstörte Ascorbinsäure	3,4	3,5

Es findet Ascorbinsäurezerstörung statt, es kann also keine Ascorbinsäure im Safran enthalten sein. Zerstört wird hierbei immer die gleiche Menge, gleichgültig wieviel Ascorbinsäure man zusetzt.

Formaldehyd-Salzsäure: Bei der Kochbehandlung mit Formaldehyd-Salzsäure fällt ein dichter, intensiv rot gefärbter Körper aus. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Kondensationsprodukt von Formaldehyd mit Crocetin, dem einen Zerfallsprodukt des Safranfarbstoffs. Das zweite, die Gentiobiose, bleibt dabei in Lösung und spaltet sich nun ihrerseits wieder auf in Glucose. Aus dieser entsteht dann wohl letzten Endes das den Indophenolfarbstoff reduzierende Spaltprodukt. — Das R.V. der abzentrifugierten, schwachgelblichen Lösung ist, wenn man die Erhöhung durch Salzsäure-Hydrolyse abrechnet, das gleiche wie vor

der Behandlung, $R.V._a = 40$; $R.V._e = 50$. (Der Wert für die Salzsäure-Hydrolyse ist aus den Ergebnissen des kalten Auszugs (s. S. 34) zu ersehen.) C-Vitamin kann also auch aus diesem Grunde nicht vorhanden sein. — Ebenso ist das R.V. vor und nach der kalten Behandlung praktisch unverändert, $R.V._a = 40$; $R.V._e = 42$.

Bleifällung: Auf Zusatz von Bleiazetat wurde keine Fällung erhalten.

Aussalzen: Bei Sättigen mit Natriumchlorid entstand kein Niederschlag.

Methylenblau: Es errechnet sich aus dem Verbrauch an Methylenblau ein R.V. von ca. 20, obwohl die qualitative Prüfung auf Eisen negativ ausfiel.

Wasserdampfdestillation: Das Destillat zeigte kein R.V. Der Rückstand hatte ein R.V. von 36. (Ein wässeriger Kochauszug ergab R.V. = 32.)

Gerbstoffreaktionen: Alle Gerbstoffreaktionen fielen negativ aus. Bei Eisenalaunzusatz war eine ganz geringe, unbedeutende Dunkelfärbung zu beobachten. Es kann sich also nur um einen äußerst kleinen Prozentzatz Gerbstoff handeln. Bei Zusatz von Bromwasser trat fast völlige Entfärbung des orangeroten Auszugs ein, aber keine Fällung.

Hydrolysezahl: Die Hydrolysezahl errechnete sich aus den Werten, die den bei der Bearbeitung des kalten Auszugs gefundenen völlig gleich waren. $R.V._E = 40$; $R.V._{HCl} = 50$; $HZ = 1{,}25$.

Verdünnungskurve: Bei der Gegenüberstellung der Titrationsresultate dreier Auszüge, die bei gleicher Flüssigkeitsmenge verschiedenen Safrangehalt hatten, ergab sich die merkwürdige Tatsache, daß die auf 10 g Safran umgerechneten R.V.-Werte untereinander nicht gleich waren:

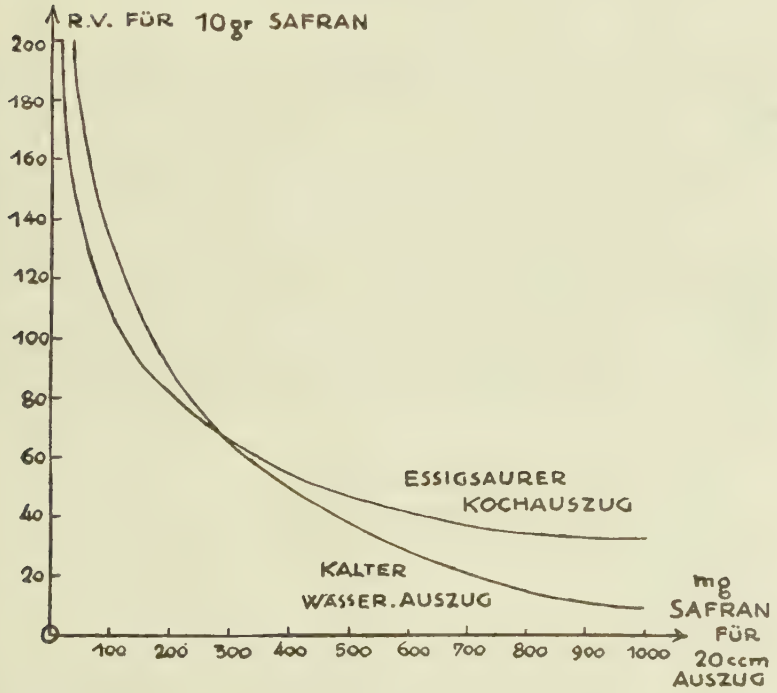
Auszug	a (3%)	b (1%)	c (0,5%)
Einwage (in g)	6,0	2,0	1,0
in ccm Flüssigkeit	200	200	200
R.V. für 10 g	42	80	124

Das R.V. war also umso größer, je verdünnter die Lösung war. Das bedeutete, daß die Menge des reduzierenden Bestandteils nicht nur beim Kochen, sondern sogar schon bei einfachem Verdünnen zunahm. Zur näheren Untersuchung dieser Feststellung titrierte ich einen Auszug, dessen Safrangehalt durch Verdünnung immer mehr abnahm. Auch aus den hierbei gefundenen Werten ergibt sich eine Kurve, diese zeigt das Bild, wie man sie von den loga-

rithmischen Kurven her kennt. — In der nachstehenden Tabelle sind die bei diesem Versuche gefundenen Werte wiedergegeben:

mg Safran in 20 ccm Lösung	theoretischer Titrationswert	gefundener Titrationswert	umgerechnet auf 10 g Safran
1000 (5%)	3,20	3,2	32
800 (4%)	2,56	3,0	38
400 (2%)	1,28	2,2	55
200 (1%)	0,64	1,6	80
160 (0,8%)	0,52	1,4	88
80 (0,4%)	0,26	1,0	125
40 (0,2%)	0,13	0,6	150
32 (0,16%)	0,10	0,5	157

Verdünnungskurven:



Auch mit dem Filtrat der Formaldehyd-Salzsäure-Fällung führte ich diesen Verdünnungsversuch durch. Es ergab sich dabei das gleiche Bild wie bei dem ursprünglichen Auszug.

Andere Safransorten: Außer der Hauptsorte untersuchte ich noch drei weitere Sorten Safran. Das R.V. der einen Sorte ergab für den essigsauren Kochauszug nur 22, die beiden anderen näherten sich mit R.V. 28 und 31 der Hauptsorte.

Der hohe Reduktionswert, der in der Arbeit von *H. Nink (3)* für Safran angegeben ist, erklärt sich offenbar daraus, daß der dort verwendete Safranauszug stark verdünnt war und deshalb, wie aus dem Verdünnungsversuch hervorgeht, weit mehr F.L. verbrauchte, als ein Extrakt mit dem hier angegebenen Gewürzgehalt der Norm. Außerdem benutzte *H. Nink* zur Titration, wie seinerzeit üblich, einen schwach schwefelsauren Auszug, der durch die Schwefelsäurehydrolyse schon an sich mehr R.V. enthielt als der hier benutzte essigsaure Kochauszug.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die verschiedenen Methoden noch nicht so eingehend durchgearbeitet, daß man sagen konnte, die oder jene wird in ihrer Anwendung brauchbare Resultate zeigen oder nicht. Daher nahm ich gerade mit dem Safran noch die verschiedensten Versuche vor, die nachher bei der Untersuchung der anderen Gewürze wegfielen, weil sie sich zur Klärung des R. V. als unzweckmäßig oder überflüssig erwiesen. Die weiteren Ergebnisse der Safranbearbeitung seien hier kurz wiedergegeben. Wichtig sind die Resultate kalter Auszüge mit verschiedenen Safrangehalten, die zusammen mit dem Resultat des bereits besprochenen (s. S. 34) kalten Auszugs nach der Norm eine Verdünnungskurve für die kalten wässerigen Auszüge ergeben. Die nachstehende Tabelle gibt die hierfür in Frage kommenden Werte wieder:

Safrangehalt:	20 ccm Auszug entsprechen g Safran:	R.V. für 10 g Safran:
5% (Norm)	1,0	7
2,5%	0,5	38
1,25%	0,25	73
0,625%	0,125	120

Die sich aus diesen Werten ergebende Kurve für den kalten wässerigen Auszug ist in dem Koordinatensystem eingezeichnet, in dem auch die Verdünnungskurve des essigsauren Kochauszugs eingetragen ist (s. S. 39).

Auszüge verschiedener Art.

1. Reihe.

Extraktionsart:	Zeit:	R.V. für 10 g:
1) H_2O_v, kalt	2 Std.	110
2) H_2O_v, kalt	24 Std.	120
3) n/100-H_2SO_4, kalt	2 Std.	120
4) n/100-H_2SO_4, kochend	10 Min.	200
5) 96%iger Alkohol + n/100-H_2SO_4 im Verhältnis 5 : 1, kalt	2 Std.	80
6) Aceton, rein + n/100-H_2SO_4 im Verhältnis 2 : 1, kalt	2 Std.	64

Es wurden hierbei jeweils 0,125 g Safran titriert (in 20 ccm).

2. Reihe.

Danach folgte eine Reihe Auszüge mit den verschiedensten Extraktionsmitteln. Dabei bestimmte ich auch jeweils die Trockensubstanz und das „Scheinbare Aequivalentgewicht". Die Bestimmung der Trockensubstanz, die im folgenden mit T.S. bezeichnet wird, geschah folgendermaßen: 20 ccm des Auszugs wurden in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft, eine Stunde im Trockenschrank bei 105° getrocknet und dann gewogen. Bei schwefelsauren Auszügen wurde die zur Neutralisation der Säure nötige Menge Natronlauge zugesetzt und das entstandene Natriumsulfat bei der Berechnung in Abzug gebracht. Diese Neutralisation war nötig, da die beim Eindampfen entstehende konzentrierte Säure eine Verkohlung herbeigeführt hätte, wodurch dann falsche Werte entstanden wären.

Das „Scheinbare Aequivalentgewicht", kurz bezeichnet mit Sch.Ae.G., errechnet sich aus der verbrauchten Menge n/1000-F.L. und der im aliquoten Teil der Lösung gefundenen T.S. Man dividiert die T.S.-Menge durch die Anzahl ccm n/1000-F.L. und multipliziert zunächst mit 1000, um die T.S.-Menge zu finden, die 1000 ccm n/1000-F.L. aequivalent ist, und dann nochmals mit 1000, um auf 1000 ccm n-F.L. zu berechnen. Dies ist dann das Sch.Ae.G. — Beispiel: Eine bestimmte Menge Extrakt verbrauchte 3,0 ccm n/1000-F.L. Dieselbe Menge Extrakt hatte eine T.S. von 0,15 g, somit

$$\text{Sch.Ae.G.} = \frac{0{,}15 \times 1000 \times 1000}{3} = 50000.$$

Benutzt wurden 1,25%ige Auszüge, 20 ccm Auszug entspra-

chen demnach 0,25 g Safran, also der doppelten Menge wie in der ersten Reihe.

Extraktionsart	Zeit	R.V. für 10 g	T.S. für 10 g	Sch.Ae.G.
7) H_2O_v, kalt	2½ Std.	75	4,655	62100
8) H_2O_v, kalt	24 Std.	73	5,260	72100
9) H_2O_v, kochend	10 Min.	105	4,835	46100
10) n/100-H_2SO_4, kalt	2½ Std.	110	4,880	44400
11) n/100-H_2SO_4, koch.	10 Min.	150	5,560	37100
12) n-H_2SO_4, kalt	2½ Std.	205	7,440	36300
13) n/2-H_2SO_4, kalt	2½ Std.	155	5,295	34200
14) n/10-H_2SO_4, kalt	2½ Std.	80	4,925	61600
15) Aceton + n/100-H_2SO_4, 1 : 1, kalt	2½ Std.	85	4,940	58100
16) Aceton + n/20-H_2SO_4, 5 : 1, kochend	10 Min.	30	2,735	91200
17) Methylalkohol + n/100-H_2SO_4, 2:1, kalt	2½ Std.	90	4,455	49600
18) Methylalkohol + n/20-H_2SO_4, 3:1, kalt	48 Std.	50	2,595	52000
19) Essigsäure, 0,5%ig, kalt	2½ Std.	80	4,710	58900
20) Essigsäure, 2,0%ig, kalt	2½ Std.	85	4,826	56800

3. Reihe.

Es folgten 6 Auszüge mit bekannten Lösungsmitteln ohne Säurezusatz. Auch hier kamen wie in der 2. Reihe Auszüge zur Titration, die 1,25% Safran entsprachen. Bei den Stoffen, die sich mit Wasser nicht mischen, und bei denen, die sich mit Nitrobenzol mischen, wurde im Wasserbad rasch zur Trockene eingedampft, mit Wasser aufgenommen, mit Essigsäure angesäuert und dann titriert.

Extraktionsart	Zeit	R.V. für 10 g	T.S. für 10 g	Sch.Ae.G.
21) Methylalkohol, kalt	3½ Std.	50	1,950	39000
22) Aethylalkohol, kalt	3½ Std.	45	0,585	13000
23) Aceton, kalt	3½ Std.	40	0,260	6500
24) Essigester, kalt	3½ Std.	30	0,150	5000
25) Chloroform, kalt	3½ Std.	30	0,115	3830
26) Aether, getrock., kalt	3½ Std.	20	0,070	3500

4. Reihe.

Anschließend titrierte ich noch Auszüge, die 0,5 g Safran in 20 ccm Extrakt entsprachen (2,5%).

Extraktionsart	Zeit	R.V. für 10 g	T.S. für 10 g	Sch.Ae.G.
27) H_2O_v, koch.	10 Min.	52	9,287	179000
28) H_2O_v, kalt	3½ Std.	37	8,383	226000
29) H_2O_v, kalt	24 Std.	38	8,947	236000
30) H_2O_v, kalt	48 Std.	43	9,027	210000
31) Aethylalkohol, koch.	10 Min.	15	2,387	159000
32) Aethylalkohol, kalt	24 Std.	10	2,410	241000
33) Aethylalkohol, kalt	40 Std.	10	2,197	220000
34) Aceton, koch.	10 Min.	6	0,060	10000
35) Aceton, kalt	3 Std.	10	0,310	31000

Die üblichen Lösungsmittel haben gegenüber dem Safranfarbstoff sehr verschiedene Extraktionskraft. Die Farbe der Auszüge nimmt von dunkelrotorange bis fast farblos ab in der Reihenfolge:

1. Wasser und verdünnte Säuren,
2. Methylalkohol,
3. Aethylalkohol,
4. Aceton,
5. Essigester,
6. Chloroform,
7. Aether, getrocknet (dieser Auszug ist fast farblos).

Parallel mit dem Abfallen der Farbintensität fällt auch, wie aus der Auszugsreihe 3 zu ersehen ist, das R.V. Es ist also anzunehmen, daß der größte Teil des R.V. auf die Hydrolyseprodukte der Zucker zurückzuführen ist, die bei der Aufspaltung des Safranfarbstoffs entstehen. — Fällungsversuche mit Aethylalkohol, Methylalkohol und Aceton blieben ohne Erfolg.

Ergebnis der Untersuchung: Das Fehlen von C-Vitamin ist am eindeutigsten dadurch erwiesen, daß zugesetztes C-Vitamin von einem bestimmten Bestandteil zerstört wird. Auch der konstantbleibende Wert bei der Formaldehyd-Salzsäure-Behandlung weist auf das Fehlen von C-Vitamin hin. Da die Abwesenheit von nennenswerten Mengen Gerbstoff, von reduzierenden aetherischen Oelen und organischen Schwefelverbindungen festgestellt werden konnte, ist das R.V. des Safrans praktisch allein auf Spaltprodukte von Kohlehydraten zurückzuführen. Von diesen stehen wohl an erster Stelle die abgespaltenen Bestandteile des Safranfarbstoffs und des Bitterstoffs Picrocrocin, also Hydrolyseprodukte der Gentiobiose, bezw. der Glucose.

2. Piment.

Allgemeines: Piment (Nelkenpfeffer, Neugewürz, Englischgewürz oder Jamaicapfeffer) ist die nicht völlig reife, an der Sonne getrocknete Beere des kleinen Baumes Pimenta officinalis Berg (Myrtaceae). Die hier am meisten interessierenden Bestandteile sind: 6—13% Wasser, 4—5% aetherisches Oel, 8—14% Gerbsäure, 20—25% Kohlehydrate, 12—14% Pentosane, 4% Pektin.

Material: Von verschiedenen Proben benutzte ich die mit dem höchsten R.V., ermittelt durch den essigsauren Kochauszug. Das Material wurde im Porzellanmörser so zerkleinert, daß die größten Stückchen danach höchstens stecknadelkopfgroß waren. Die titrierten Auszüge entsprachen 10% Piment.

Kalter Auszug:	mit Wasser:	mit Essigsäure:
R.V. nach 20 Stunden	0	0
R.V. nach Aufkochen	4	—
Durch Essigsäure-Hydrolyse	6	8
Durch Salzsäure-Hydrolyse	11	12

Der Wert R.V. = 0 zeigte sich in der ganzen Versuchsreihe der kalten Auszüge. Bei keiner Extraktionszeit war R.V. festzustellen. — Der kalte wässerige Auszug hatte $p_H = 4.9$ bei der Hauptsorte, 5,4 bei der Sorte 2. Auch der kalte wässerige und der kalte essigsaure Auszug der Sorte 2 hatten kein R.V.

Essigsaurer Kochauszug: R.V. = 63. Die Titration mit Nitrobenzol konnte nach dem Zentrifugieren ohne Störung vorgenommen werden. Bei der gewöhnlichen Titration auf blau erhielt ich R.V. = 290, eine Zahl, die dem Wert 390 von *H. Nink (3)* nahe kommt, zumal wenn man noch berücksichtigt, daß *Nink* nicht einen essigsauren, sondern einen schwach schwefelsauren Auszug benutzte. — Als Werte für den erschöpfenden Auszug sind zu nennen: $R.V._2 = 33$, $R.V._3 = 19$.

Bei der Titration mit Nitrobenzol nahm ich zum Vergleich mit der Norm-Titration, wie sie im Kapitel „Allgemeiner Teil" genau festgelegt ist (s. S. 14), eine Aenderung in der Form vor, daß ich die Zeit zwischen F.L.-Zugabe und Ausschütteln auf 30 Sekunden herabsetzte. Dadurch erniedrigte sich das R.V. von 63 (bei 3 Minuten) auf 12. Trotzdem kein C-Vitamin im Piment enthalten ist, kann man diesen Wert als Spontanreduktionswert betrachten. Das ist ein Beweis dafür, daß man die Spontanentfärbung nicht immer auf C-Vitamin beziehen und den dadurch gefundenen Wert auf dieses umrechnen darf.

Lufteinwirkung und Haltbarkeit unter Stickstoff: Die hierfür in Frage kommenden Versuche führte ich mit drei verschiedenen Sorten durch.

Sorte 1 (Hauptsorte): Das R.V. war nach zweistündigem Luftdurchleiten in kalter, 0,2%ig essigsaurer Lösung von 63 auf 60 zurückgegangen. Nach einem 40 Stunden langen Stehen an Luft bei gleichem Anfangs-R.V., in ebenfalls 0,2%ig essigsaurer Lösung, fand ich immer noch 60. Daran anschließend leitete ich außerdem noch einmal 1 Stunde Luft durch, aber auch dadurch fiel das R.V. nur auf 58. Ein Kochversuch in neutraler Lösung wie bei Safran ergab beim Luftdurchleiten nach 1 Stunde einen Abfall von 63 auf 53, nach 2 Stunden auf 49. Auch in 0,2%ig essigsaurer Lösung beim Kochen untersuchte ich die Veränderung des R.V. Nach 4 Stunden Kochzeit betrug das R.V. unter Luft immer noch 57, unter Stickstoff war sogar eine Steigerung auf 75 aufgetreten. — Die Nachprüfung eines Auszugs, der nach 8stündigem Stehen unter Stickstoff sein R.V. von 63 beibehalten hatte, zeigte auch nach 20stündigem Stehen im Eisschrank keine wesentliche Veränderung (R.V. = 62).

Sorte 2: Hier fiel das R.V. rascher. Nach 2tägigem Stehen unter Stickstoff in 0,2%ig essigsaurer Lösung war es von 60 auf 28 zurückgegangen.

Sorte 3: Die rascheste Abnahme des R.V. war bei der dritten Sorte zu beobachten. Nach 24stündigem Stehen unter Stickstoff in 0,2%ig essigsaurer Lösung erhielt ich statt 33 nur noch 14.

Prune: Es ergab sich weder kalt noch kochend ein R.V.

Ascorbinsäurezusatz:	Menge a	Menge 2a
R.V.-Anteil des Auszugs	3,1	3,1
R.V.-Anteil der zugesetzten Ascorbinsäure	6,0	11,9
Theoretischer Wert für 20 ccm Mischung	9,1	15,0
Praktischer Titrationswert	5,3	7,5
Differenz, zerstörte Ascorbinsäure	3,8	7,5

Das Fehlen des C-Vitamins im Piment ist dadurch erwiesen. Die Vitaminzerstörung ist hier umso stärker, je mehr Vitamin C man zusetzt.

Auch mit dem Filtrat der Bleifällung habe ich den Zusatzversuch ausgeführt. Der zu erwartende Wert war 3,2, ich erhielt aber nur 0,9, die Differenz hierbei war also 2,3.

Formaldehyd-Salzsäure: Schon in der Kälte entstand ein feiner weißer Niederschlag. Der Auszug verlor dabei die Hälfte seines R.V. durch das Ausfallen des Katechingerbstoffes. In der Hitze schien in diesem Falle aber die Hydrolysenwir-

kung der kochenden Salzsäure in den Vordergrund zu treten, denn das R.V. ging von 55 nur auf 46 zurück. Die Formaldehyd-Salzsäure-Behandlung, auf die Sorte 2 angewandt, brachte sogar eine Steigerung um ein Zehntel.

Bleifällung: Der Bleifällung in der gewöhnlichen 2%ig essigsauren Lösung stellte ich zwei weitere gegenüber, und zwar Lösungen, die 0,2%ig und 4,0%ig essigsauer waren. Das R.V. nahm hierbei umso mehr ab, je schwächer sauer das Medium war.

Anfangs-R.V. = 63.	wiedergefundenes R.V.
Fällung in 0,2%ig essigsaurer Lösung	13, also ca. $^1/_5$
Fällung in 2,0%ig essigsaurer Lösung	19, also ca. $^1/_3$
Fällung in 4,0%ig essigsaurer Lösung	25, also ca. $^2/_5$.

Die überstehenden Lösungen waren fast wasserhell. — Für eine andere Sorte erhielt ich die Werte: $R.V._a = 60$, $R.V._e = 10$.

Aussalzen: Durch das Aussalzen geht ein Drittel des R.V. verloren, also so viel, wie bei der Bleifällung in 2,0%ig essigsaurer Lösung. Beidesmal ist der Verlust wahrscheinlich zum größten Teil auf Tanningerbstoffe zurückzuführen.

Methylenblau: 2,5 ccm Methylenblau werden bereits ohne Zusatz von Natriumoxalat verbraucht. Die Lösung wird dabei trübgrau. Der Wert für die Titration mit Oxalat ist 3,6 ccm für 2 g Gewürz, das R.V. für 10 g ist danach 18.

Wasserdampfdestillation: Reduzierende aetherische Oele und organische Schwefelverbindungen sind nicht vorhanden. Das überdestillierte aetherische Oel bildet in dem Destillat einen großen Tropfen, der F.L. ohne Entfärbung in sich aufnimmt und sich dadurch orangegelb färbt. — Der Rückstand der Wasserdampfdestillation hat gegenüber dem essigsauren Kochauszug ein R.V., das etwas tiefer liegt, und zwar 60 gegenüber 63.

Gerbstoffreaktionen: Eisenalaun färbt tiefschwarzblau, die Reaktion ist also stark positiv. Mit Bromwasser entsteht ein ganz geringer Niederschlag. Die Fällungen mit basischem und neutralem Bleiazetat sind beide stark positiv. — Es ist also in der Hauptsache Tanningerbstoff, in untergeordneter Menge Katechingerbstoff vorhanden. Es ist dabei allerdings nicht geklärt, warum trotz der geringen Menge Katechingerbstoff die Formaldehyd-Salzsäure-Behandlung in der Kälte eine Verminderung des R.V. um die Hälfte bewirkt. Möglich ist allerdings, daß der betreffende Katechingerbstoff an sich ein bedeutend höheres R.V. hat als der Tanningerbstoff, daß also mit seinem Ausfallen auch der Wert für das verschwundene R.V. verhältnismäßig hoch wird.

Hydrolysezahl: Die Hydrolysezahl ist hier 1,7, durch Kochen mit Salzsäure wurde das R.V. von 60 auf 100 erhöht. Benutzt man statt Salzsäure als Medium eine 1%ige Schwefelsäure, dann erhält man nach 10 Minuten Kochzeit 88, nach der Norm-Kochzeit (30 Min.) fast den gleichen Wert wie mit Salzsäure (102).

Verdünnungskurve: Das R.V. ändert sich beim Verdünnen nicht, als Verdünnungskurve ergibt sich also eine Gerade.

Andere Pimentsorten: Ich fand für die einzelnen Pimentsorten R.V.-Werte zwischen 0 und 63. Wie sich im Laufe der Bearbeitung herausstellte, zeigten sie auch oft recht unterschiedliches Verhalten bei der Anwendung der verschiedenen Methoden. — Ich erhielt für die essigsauren Kochauszüge noch folgende Werte:

Sorte	R.V. (10 g)	Sorte	R.V. (10 g)	Sorte	R.V. (10 g)
ganz eingekauft:		5	0	gemahlen eingekauft:	
1	63	6	4	10	20
2	60	7	6	11	15
3	33	8	60	12	4
4	15	9	10	13	20

Die Farbe der Pimentauszüge ist dunkelrotviolett, bei Zusatz von Natriumazetat wird sie gelblichrot, durch Natronlauge bräunlich und bei Zusatz von Säure ändert sie sich mehr nach rosa hin.

Die austitrierten Lösungen nehmen sehr rasch eine opalisierende Trübung an, das mit überschüssiger F.L. gelbrot bis rot gefärbte Nitrobenzol verliert sehr bald wieder diese Färbung und wird fast so grünlichgelb wie am Anfang.

Ergebnis der Untersuchung: C-Vitamin ist, wie das Resultat der Ascorbinsäurezusatz-Methode erweist, nicht in Piment vorhanden. Daß der kalte Auszug den Wert R.V. = 0 hat, und daß beim Kochen daraus R.V. entsteht, ist ein weiterer Beweis für das Fehlen des C-Vitamins. Ebenso deutet der negative Ausfall der Prunetitrationen darauf hin. Schwieriger zu beantworten ist die Frage nach dem tatsächlich vorhandenen reduzierenden Körper. Aetherische Oele und organische Schwefelverbindungen scheiden aus. Gallotanningerbstoffe sind reichlich vorhanden, Katechingerbstoffe in geringerem Maße. Ein Gehalt an Kohlehydraten, Pentosanen und Pektin ist aus der Literatur bekannt (s. S. 44). Wie sich das Gesamt-R.V. auf die Spaltprodukte der einzelnen Komponenten verteilt, konnte mit Hilfe der hier angegebenen Methoden nicht festgestellt werden.

3. Pfeffer.

Allgemeines: Man unterscheidet im Handel zwischen schwarzem und weißem Pfeffer; beide sind die Beerenfrucht derselben Pflanze (Piper nigrum L., Piperaceae). Der schwarze Pfeffer ist die unreife, noch grüne, an der Sonne oder über Feuer getrocknete, durch Schrumpfung gerunzelte Frucht. Der weiße Pfeffer ist die reife, von der äußeren Fruchtschale befreite und getrocknete Frucht. Wichtige Bestandteile sind:

Mittelwerte:	Schwarzer Pfeffer:	Weißer Pfeffer:
Wasser	13 %	14 %
Pentosane	5 %	2 %
Aetherisches Oel	2 %	2 %
Stärke	37 %	57 %

a) Schwarzer Pfeffer.

Die schwarzen Pfefferkörner zerrieb ich im Porzellanmörser möglichst weitgehend. Zur Titration benutzte ich Lösungen, die 10% Gewürz entsprachen.

Kalter Auszug:	mit Wasser:	mit Essigsäure:
R.V. nach 20 Stunden	0	0
R.V. nach Aufkochen	6	—
Durch Essigsäure-Hydrolyse	6	7
Durch Salzsäure-Hydrolyse	7	8

Keines der Einzelstadien der kalten Auszugsreihe hatte R.V. Im kalten wässerigen Auszug war $p_H = 6{,}0$.

Essigsaurer Kochauszug: Durch den hohen Stärkegehalt des Pfeffers waren die Extrakte zähflüssig und selbst durch Gaze schwer zu filtrieren. Nach dem Zentrifugieren konnte ich jedoch ohne Schwierigkeiten titrieren und erhielt $R.V._1 = 16$; $R.V._2$ 10; $R.V._3$ 4 (erschöpfender Auszug). — Auf blau titriert erhielt ich R.V. = 80, während *H. Vink (3)* 300 angegeben hatte. Dieser große Unterschied ist darauf zurückzuführen, daß sie einen schwach schwefelsauren Auszug zur Titration benutzt hatte und in der Hauptsache wohl darauf, daß sie das Gewürz in der Gewürzmühle gemahlen hatte und das Extrakt daher viel Eisen enthielt.

Lufteinwirkung: In 0,2%ig essigsaurer Lösung ist das R.V. nach 20 Stunden von 16 auf 6 gesunken.

Haltbarkeit unter Stickstoff: Ebenfalls in 0,2%ig essigsaurer Lösung hält sich das R.V. unter Stickstoff 8 Stunden lang und selbst über Nacht im Eisschrank fast unverändert. Nach

2 Tagen ist allerdings über die Hälfte verloren gegangen, R.V. = 7. Durch Aufkochen dieser Lösung kann man das R.V. wieder auf 14 bringen.

Prune: Für die Prune-heiß-Titration war R.V. = 0. Bei der Prune-kalt-Titration beobachtete ich die merkwürdige Tatsache, daß mehr Titantrichlorid verbraucht wurde, als der zugesetzten Menge Prune entsprach. Das Titantrichlorid wird demnach zuerst teilweise oxydiert und reduziert erst dann das zugesetzte Prune. 0,51 ccm n/100-Titantrichlorid werden von 2 g Gewürz oxydiert. Das hier auftretende Oxydationsvermögen ist für 10 g Gewürz demnach 2,55 ccm n/100, bezw. 26 ccm n/1000-Prunelösung.

Ascorbinsäurezusatz:	Menge a	Menge 2a
R.V.-Anteil des Auszugs	1,6	1,6
R.V.-Anteil der zugesetzten Ascorbinsäure	4,2	8,3
Theoretischer Wert für 20 ccm Mischung	5,8	9,9
Praktischer Titrationswert	3,9	7,9
Differenz, zerstörte Ascorbinsäure	1,9	2,0

C-Vitamin ist im schwarzen Pfeffer demnach nicht vorhanden. Die Menge des zerstörten Vitamins bleibt unabhängig von der zugesetzten Menge konstant.

Formaldehyd-Salzsäure: Trotzdem der Niederschlag nicht allzu stark ist, geht das R.V. sowohl bei der kalten Behandlung, als auch beim Kochen auf die Hälfte zurück. Vielleicht liegt auch hier — ähnlich wie bei Piment — ein Katechingerbstoff vor, der bei geringer Menge doch höheres R.V. besitzt.

Bleifällung: Durch Bleiazetat in 2%ig essigsaurer Lösung erhielt ich eine Fällung, die fast das gesamte R.V. enthielt; $R.V._a = 16$, $R.V._e = 2$. Bei einer anderen Sorte, ausgehend von R.V. = 7, war kein R.V. mehr vorzufinden.

Aussalzen: Auch der Natriumchloridzusatz brachte das R.V. fast völlig zum Verschwinden; $R.V._a = 16$, $R.V._e = 2—3$.

Methylenblau: Es fand keine Entfärbung statt.

Wasserdampfdestillation: Das Destillat der Wasserdampfdestillation zeigte kein R.V., für den Rückstand ergab sich R.V. = 14.

Gerbstoffreaktionen: Bei Zusatz von Eisenalaun trat eine Verfärbung nach braungrün ein; Bromwasser bewirkte auch hier Entfärbung, ein Niederschlag trat dabei nicht auf. Basisches Bleiazetat war wie neutrales stark positiv.

Es ist möglich, daß es sich bei der Blei- und Kochsalzfällung überhaupt nicht um einen der üblichen Tanningerbstoffe handelt.

Wäre ein solcher vorhanden, so müßte die Färbung mit Eisenalaun mehr blauviolett sein. Die verhältnismäßig geringe grünliche Färbung, die auftritt, spricht für Katechingerbstoff in geringen Mengen.

Hydrolysezahl: $R.V._{E} = 16$, $R.V._{HCl} = 23$, $HZ = 1{,}4$. Für eine andere Sorte ergeben sich ähnliche Verhältnisse: $R.V._{E} = 10$, $R.V._{HCl} = 15$, $HZ = 1{,}5$.

Verdünnungskurve: Das R.V. ändert sich beim Verdünnen nicht, als Verdünnungskurve ergibt sich also eine Gerade.

Andere Sorten des schwarzen Pfeffers: Außer der Hauptsorte mit $R.V._{E} = 16$ lagen vor: 2. $R.V._{E} = 14$, 3. $R.V._{E} = 10$, 4. $R.V._{E} = 7$, 5. $R.V._{E} = 0$.

Ergebnis der Untersuchung: C-Vitamin ist im schwarzen Pfeffer nicht enthalten. Das ergibt sich aus dem Vitaminzusatz-Versuch, dem negativen Ausfall der Prunetitration und den Resultaten der kalten Auszüge. Das beobachtete R.V. ist nur auf Spaltprodukte der Gerbstoffe und der Kohlehydrate zurückzuführen, da reduzierende aetherische Oele, organische Schwefelverbindungen und Eisen nicht vorhanden sind.

b) Weißer Pfeffer.

Außer dem schwarzen, untersuchte ich auch den weißen Pfeffer. Bei der kalten Auszugsreihe konnte ich in keiner Zeitspanne R.V. finden. Ebenso wiesen drei weitere Sorten $R.V. = 0$ auf. Aber auch die essigsauren Kochauszüge aus drei verschiedenen Sorten verhielten sich so. Durch Kochen mit Salzsäure konnte ebenfalls kein R.V. erhalten werden. Die Untersuchung wurde daher eingestellt. Der Wert von *H. Nink (3)* $R.V. = 70$ ist sicherlich auf Eisen zurückzuführen, da auch der weiße Pfeffer in einer Gewürzmühle gemahlen wurde.

Der weiße Pfeffer enthält nach diesen Feststellungen weder Vitamin C noch sonstige reduzierende Körper.

4. Thymian.

Allgemeines: Thymian oder Gartenthymian ist eine Labiate, die namentlich als Wurstgewürz Verwendung findet. In den Handel kommen die abgestreiften, getrockneten Blätter und Blüten. Außer 2% aetherischem Oel sind an hier interessierenden Bestandteilen in der Literatur keine zu finden.

Material: Zur Untersuchung wurde der handelsübliche, gerebelte Thymian benutzt. Er kam ohne weitere Zerkleinerung zur

Untersuchung. Die Auszüge wurden mit einem Gehalt titriert, der 5% Thymian entsprach.

Kalter Auszug:	mit Wasser:	mit Essigsäure:
R.V. nach 20 Stunden	0	0
R.V. nach Aufkochen	20	—
Durch Essigsäure-Hydrolyse	26	20
Durch Salzsäure-Hydrolyse	13	11

Essigsaurer Kochauszug: $R.V._E = 43$ für die Sorte mit dem höchsten R.V. Die Titration mit Nitrobenzol bereitete keinerlei Schwierigkeiten. Das gelbrote bis rote Nitrobenzol war am nächsten Tage entfärbt. Der erschöpfende Auszug hatte hier folgende Resultate: Bei der 2. Extraktion fand sich das R.V. unverändert noch einmal, erst dann war deutliche Abnahme zu bemerken.

$R.V._1 = 43$ $R.V._3 = 26$ $R.V._5 = 11$
$R.V._2 = 42$ $R.V._4 = 18$ $R.V._6 = 3.$

Der Farbstoffverbrauch bei der Titration auf blau errechnete sich zu 80, in einem anderen Falle zu 110, bei *H. Nink (3)* zu 120.

Lufteinwirkung: In 0,2%ig essigsaurer Lösung wird durch Lufteinwirkung in 10 Stunden das R.V. von 43 auf 12 erniedrigt. Bei 2tägigem Stehen: R.V. = 0. Aus diesem Auszug ist durch erneutes Kochen mit Salzsäure kein R.V. mehr zu erhalten. Auch das Filtrat der Bleifällung (2% Essigsäure) verhielt sich ähnlich, es ging über Nacht von 29 auf 14 zurück. Der Auszug einer anderen Thymiansorte zeigte dabei $R.V._a = 24$, $R.V._e = 7$.

Haltbarkeit unter Stickstoff: Auch unter Stickstoff nimmt das R.V. eines Thymianauszugs verhältnismäßig rasch ab, entgegengesetzt zu den bisher behandelten Gewürzen. So wurde festgestellt, daß bei dem Auszug mit $R.V._a = 43$ nach 6 Stunden $R.V._e$ nur noch 22 war. Der Rückgang beträgt also für 60 Min. 3,5. Diese Tatsache muß natürlich bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse berücksichtigt werden. Findet man also 60 Min. nach Feststellung des $R.V._a = 43$ ein $R.V._e = 30$, nachdem irgend ein Untersuchungsverfahren durchgeführt worden ist, dann darf als Vergleichswert nicht $R.V._a = 43$, sondern nur $R.V._a = 43 - 3{,}5 = 39{,}5$ in Rechnung gesetzt werden. Alle hier für Thymian angegebenen Werte sind auf diese Art errechnet.

Prune: Die Prunetitration ist weder kalt noch kochend durchführbar, weil der Auszug durch seine rotbraune Farbe den Umschlag bei der Titration stark verdeckt. Die Prunetitration wurde deshalb mit dem Filtrat der Bleifällung ausgeführt, die ja bei

Thymian — abgesehen von den wenigen mit niedergerissenen Mengen — das gesamte Vitamin C enthalten müßte. Prune-kochend und Prune-kalt ergeben aber kein nennenswertes R.V. (kochend 4, kalt 2). Die Werte liegen innerhalb der Fehlergrenze der Prunemethode.

Ascorbinsäurezusatz:	Menge a	Menge 2 a	Sorte 2
R.V.-Anteil des Auszugs	2,05	1,95	2,0
R.V.-Anteil d. zuges. Ascorbinsäure	4.70	9.20	7,2
Theoretischer Wert für 20 ccm Mischg.	6.75	11,15	9,2
Praktischer Titrationswert	3,60	5,50	7,9
Differenz, zerstörte Ascorbinsäure	3.15	5.65	1.3

Wie aus der obigen Aufstellung ersichtlich, benutzte ich zu diesem Versuche auch eine zweite Sorte, und zwar setzte ich zu dieser eine Ascorbinsäurelösung zu, die einen anderen Gehalt hatte als die bei der Hauptsorte benutzte Lösung. Es zeigte sich, daß die Sorte 2 eine geringere Zerstörungsstärke hatte als die Hauptsorte.

Formaldehyd-Salzsäure: Auf die korrigierten Werte der Anfangstitration bezogen, erhielt ich bei der Formaldehyd-Salzsäure-Behandlung in beiden Fällen eine Abnahme um die Hälfte,

kochend: $R.V._a = 41$, $R.V._e = 22$,
kalt: $R.V._a = 38$, $R.V._e = 19$.

Bleifällung: Die Bleifällung führte ich zweimal nebeneinander mit dem gleichen Auszug unter den gleichen Bedingungen aus. Die Resultate sind gut übereinstimmend, ein Viertel des R.V. fällt aus:

1. $R.V._a = 40$, $R.V._e = 31$,
2. $R.V._a = 39$, $R.V._e = 29$.

Die abzentrifugierten Lösungen waren schwach gelblich.

Aussalzen: Das goldgelbe Filtrat des Aussalzversuches zeigte bei einem Anfangs-R.V. von 36 noch ein Rest-R.V. von 14. Bei der Wiederholung dieses Versuches waren die Resultate $R.V._a = 34$, $R.V._e = 8$.

Methylenblau: Bei der Methylenblautitration ergibt sich R.V. = 5, ein Wert, der beinahe noch innerhalb der Fehlergrenze dieser Titration liegt. Auch war der qualitative Nachweis für Eisen negativ.

Wasserdampfdestillation: Im Destillat war kein R. V. vorzufinden, das R.V. des Rückstandes betrug 41.

Gerbstoffreaktionen: Eisenalaun gibt schwarzgrüne Färbung, mit Brom tritt eine geringe Trübung auf, basisches und

neutrales Bleiazetat bewirken starke Fällungen. Bei dem Versuch, die Katechingerbstoffe mit Formaldehyd in salzsaurer Lösung zu fällen, konnte festgestellt werden, daß schon bei Zusatz von Salzsäure allein eine braunrote Ausflockung stattfand.

Hydrolysezahl: Entgegengesetzt zu den bisherigen Erfahrungen verkleinert sich hier das R.V. durch Kochen mit Salzsäure. Auch aus den Resultaten der Kochbehandlungen der kalten Auszüge geht dies hervor (s. S. 51). Für den essigsauren Kochauszug ist $R.V._{E} = 37$ (korrigiert), nach der Behandlung mit Salzsäure ist $R.V._{HCl} = 22$, $HZ = 0{,}6$.

Verdünnungskurve: Unter Berücksichtigung der Abnahme des R.V. parallel der verstrichenen Zeit ergibt sich auch hier als Verdünnungskurve eine Gerade.

Andere Thymiansorten: Die gefundenen $R.V._{E}$-Werte sind Sorte 1: 43, Sorte 2: 19, Sorte 3: 39, Sorte 4: 25. Sorte 5, gemahlen: 11 (beim Kochen stark schäumend).

Ergebnis der Untersuchung: Vitamin C ist am R.V. des Thymians nicht beteiligt. Begründet ist diese Behauptung durch die Resultate des Zusatzversuches und die des kalten Auszuges. Da auch aetherische Oele, organische Schwefelverbindungen, Eisen und Kohlehydrate fehlen, verteilt sich das R.V. auf Spaltprodukte der Tanningerbstoffe und auf solche der Katechingerbstoffe. Da sich aber bisher bei den Katechingerbstoffen durch Kochen immer hohes R.V. gegen Prune einstellte, spricht der bei Thymian gefundene niedere Wert R.V. = 4 gegen nennenswerte Mengen Katechingerbstoff.

5. Majoran.

Allgemeines: Unter Majoran versteht man das getrocknete, blühende Kraut der Labiate Majorana hortensis Much. Er enthält u. a. ca. 8 % Wasser, 2 % aetherisches Oel, 8 % Pentosane, 4 % Pektin.

Material: Der Majoran wurde in der handelsüblichen, gerebelten Form ohne weitere Zerkleinerung extrahiert. Die titrationsfertigen Extrakte entsprachen einem Gehalt von 5% Gewürz.

Kalter Auszug:	mit Wasser:	mit Essigsäure:
R.V. nach 20 Stunden	0	0
R.V. nach Aufkochen	8	—
Durch Essigsäure-Hydrolyse	10	10
Durch Salzsäure-Hydrolyse	0	0

Auch bei den Reihen der kalten Majoranauszüge hatte keines der

verschiedenen Extrakte ein R.V. Untersucht wurden drei verschiedene Sorten. Für den kalten wässerigen Auszug ergab sich in zwei Fällen $p_H = 6{,}0$, bei Sorte 3 $p_H = 5{,}7$.

Essigsaurer Kochauszug: R.V. = 16. Für die Titration auf blau: R.V. = 60. Für den erschöpfenden Auszug: $R.V._1 = 16$, $R.V._2 = 12$, $R.V._3 = 3$. Interessant ist, daß sich bei der Titration mit Nitrobenzol R.V. = 0 errechnete, wenn ich die Einwirkungszeit der F.L. von 3 Min. auf 30 Sek. herabsetzte.

Lufteinwirkung: Wenn über Nacht in 0,2%ig essigsaurer Lösung stehen gelassen wurde, war ein Abfall des R.V. von 16 auf 7 zu beobachten. Nach anschließendem 3stündigem Luftdurchleiten war R.V. = 4.

Haltbarkeit unter Stickstoff: Der Auszug mit $R.V._a = 16$ ergab zwar bei 20stündigem Stehen unter Stickstoff im Eisschrank $R.V._e = 8$, nach Kochen mit Salzsäure erhielt ich aber $R.V._a = 16$ wieder. Bei 8stündigem Stehen betrug die Abnahme nur 3: $R.V._a = 16$, $R.V._e = 13$.

Prune: Wie bei Pfeffer (s. S. 49) reagierte der Auszug nicht mit Prune-kalt, verbrauchte aber Titantrichlorid. Das Oxydationsvermögen diesem gegenüber war hierbei 61. Prune-kochend: R. V. = 44.

Ascorbinsäurezusatz:	Menge a	Menge 2a
R.V.-Anteil des Auszugs	1,0	1,0
R.V.-Anteil der zugesetzten Ascorbinsäure	2,9	5,7
Theoretischer Wert für 20 ccm Mischung	3,9	6,7
Praktischer Titrationswert	2,3	3,5
Differenz, zerstörte Ascorbinsäure	1,6	3,2

Auch hier fand wieder Zerstörung des C-Vitamins statt, also ist dieses auch im Majoran nicht enthalten.

Formaldehyd-Salzsäure: Das gesamte R.V. verschwindet bei der Kochbehandlung. Doch ist dabei zu berücksichtigen, daß kochende Salzsäure das R.V. zerstört, wie bereits bei dem kalten Auszug gezeigt wurde. Allerdings ist auch der nach der Formaldehyd-kalt-Behandlung gefundene Wert nur sehr gering: $R.V._a = 16$, $R.V._e = 2$.

Bleifällung: Das Filtrat der Bleifällung enthält trotz des starken Niederschlages noch $^4/_5$ des R.V.: $R.V._a = 15$, $R.V._e = 12$.

Aussalzen: Hier liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt, die Abscheidung ist gering, aber nur $^2/_5$ des R.V. bleibt zurück: $R.V._a = 15$, $R.V._e = 6$.

Methylenblau: Es wird praktisch kein Farbstoff reduziert.

Wasserdampfdestillation: Das Destillat zeigt kein R.V., das R.V. des Rückstandes beträgt 11.

Gerbstoffreaktionen: Starke Dunkelfärbung nach schwarzgrün mit Eisenalaun besagt, daß die Katechingerbstoffe im Vordergrund stehen. Dagegen zeigt die nur schwache Trübung mit Bromwasser das Gegenteil an, danach wäre nur wenig Katechingerbstoff vorhanden. Bleiazetat bewirkt basisch und schwach essigsauer starke Fällungen.

Hydrolysezahl: Durch Kochen mit Salzsäure wird das R.V., wie bereits bei anderen Versuchen festgestellt, zum Verschwinden gebracht, HZ = 0.

Verdünnungskurve: Das R.V. ändert sich beim Verdünnen nicht, als Verdünnungskurve ergibt sich also eine Gerade.

Andere Majoransorten: Eine zweite Sorte des Gewürzes verhielt sich genau so wie die Hauptsorte, $R.V._{.E} = 16$.

Ergebnis der Untersuchung: Das Vitamin C ist am R.V. des Majorans nicht beteiligt, wie der Ascorbinsäurezusatz und die Resultate des kalten Auszugs eindeutig beweisen. Auch die Prune-kalt-Titration zeigte, wie erwähnt, kein R.V. Ebenso scheiden Eisen-II, aetherische Oele und organische Schwefelverbindungen aus. Nur Spaltprodukte der Gerbstoffe und Kohlehydrate bewirken das R.V. Von den Gerbstoffen werden wohl die Katechingerbstoffe maßgebend an dem R.V. beiteiligt sein, zumal da auch die Prune-heiß-Titration hohes R.V. errechnen ließ.

6. Paprika.

Allgemeines: Paprika (Spanischer Pfeffer) ist die reife, saftlose Frucht von Capsicum annuum L. Die rote Farbe der Frucht (Capsicumrot) besteht hauptsächlich aus Capsanthin, in geringerer Menge ist Carotin vorhanden. Von *Szent-Györgyi* (Szeged, Ungarn) wurden im Paprika sehr erhebliche Mengen des C-Vitamins aufgefunden. Allerdings wurden dazu frische Früchte benutzt. Die getrocknete Frucht des Handels wurde bisher noch nicht auf C-Vitamingehalt untersucht. Sonstige Bestandteile sind: 12 % Wasser, 1 % aetherisches Oel, 3 % Pektin, 8 % Pentosane.

Material: Der zu untersuchende Paprika wurde nach Entfernung des Stieles mit der Hand in kleine Stückchen zerrissen und so, zusammen mit dem in den Früchten enthaltenen Samen, extrahiert. Die Auszüge entsprachen bei der Titration 5 % Paprika.

Kalter Auszug: Der Paprikafarbstoff geht bei der Titration des kalten Auszugs teilweise in das Nitrobenzol über und färbt dieses orange. Bei Zusatz von 0,1 und 0,2 ccm F.L. waren

die Nitrobenzolschichten untereinander gleich, bei 0,3 ccm war das Nitrobenzol jedoch schon etwas anders gefärbt, und zwar mehr nach rot, herrührend von überschüssiger F.L. Ein Zusatz von 0,4 ccm ließ im Nitrobenzol ganz deutlich Uebertitration erkennen. Das R.V. war hiernach maximal 3, da 20 ccm Extrakt 1,0 g Paprika entsprachen. Bei allen anderen kalten Auszügen war die gleiche Beobachtung zu machen. Ich titrierte dann 20 ccm, die 2,0 g Gewürz entsprachen, und fand dabei genau dieselbe Erscheinung. Hier hatte ich also jetzt für 2,0 g einen Maximalverbrauch von 0,3 ccm F.L., daher konnte ich als Maximal-R.V. 1.5 in Rechnung setzen. Es ist anzunehmen, daß der kalte Auszug überhaupt kein R.V. hat. Da 0.088 mg Ascorbinsäure 1.0 ccm F.L. verbrauchen, könnten in 10 g des untersuchten Paprikas, wenn man den Maximalwert R.V. = 1,5 zugrunde legt, immerhin 0.132 mg C-Vitamin vorhanden sein, das bedeutete aber erst einen Prozentgehalt von 0,00132.

Nach dem Kochen geht der Paprikafarbstoff nicht mehr in das Nitrobenzol über, die Titration mit Nitrobenzol ist danach ohne Schwierigkeiten ausführbar, die Färbungen im Nitrobenzol sind gut zu erkennen. Die Resultate des kalten Auszugs sind:

Kalter Auszug:	mit Wasser:	mit Essigsäure:
R.V. nach 20 Stunden	max. 1,5	max. 1,5
R.V. nach Aufkochen	12	—
Durch Essigsäure-Hydrolyse	14	15
Durch Salzsäure-Hydrolyse	19	20

Essigsaurer Kochauszug: R.V. = 19. Bei der Titration auf blau erreichte ich ein R.V. von ca. 50, während *H. Nink (3)* 84 erhalten hatte, bedingt durch die Benutzung eines schwach schwefelsauren Extraktes. Der erschöpfende Auszug brachte die Resultate: $R.V._1 = 19$, $R.V._2 = 10$, $R.V._3 = 3$. — Setzte ich bei der Nitrobenzoltitration die Einwirkungszeit der F.L. von 3 Min. auf 30 Sek. herunter, dann errechnete sich R.V.=0.

Lufteinwirkung: Nach 10stündigem Stehen unter Luft in 0,2%ig essigsaurer Lösung war das R.V. noch 9 ($R.V._8 = 19$), nach 2 Tagen $R.V._6 = 0$.

Haltbarkeit unter Stickstoff: Der Auszug stand in 0,2%ig essigsaurer Lösung 20 Stunden unter Stickstoff im Eisschrank. Sein R.V. ging dadurch von 20 auf 13 zurück. Wurde er danach wieder gekocht (30 Min.), dann stellte sich $R.V._8 = 20$ wieder ein. 8stündiges Stehen unter Stickstoff setzte das R.V. nur auf 18 herab.

Prune: Prune-kalt-R.V. = 0; Prune-heiß-R.V. = 50.

Ascorbinsäurezusatz:	Menge a	Menge 2a
R.V.-Anteil des Auszugs	1,8	1,8
R.V.-Anteil der zugesetzten Ascorbinsäure	3,3	6,5
Theoretischer Wert für 20 ccm Mischung	5,1	8,3
Praktischer Titrationswert	3,9	6,0
Differenz, zerstörte Ascorbinsäure	1,2	2,3

Auch hier findet demnach wider Erwarten Ascorbinsäurezerstörung statt. Das steht natürlich in krassem Gegensatz zu der Tatsache, daß man aus Paprikafrüchten C-Vitamin hergestellt hat. Wie aber bereits oben erwähnt, benutzte man zur Darstellung des C-Vitamins frische Paprikafrüchte, während hier dagegen die getrocknete und lange gelagerte Frucht zur Untersuchung kam. Es steht also fest, daß der Paprika beim Trocknen oder Lagern sein Vitamin C verliert. Andererseits bildet sich beim Lagern ein Stoff, der auf Vitamin C zerstörenden Einfluß hat. Ob nun das Vitamin C beim Trocknen und Lagern durch die Einwirkung der Luft oxydiert wird oder parallel mit der Entstehung des zerstörenden Körpers von diesem angegriffen wird, steht nicht fest.

Formaldehyd-Salzsäure: In beiden Fällen geht das R.V. etwa in gleichem Maße zurück, und zwar durch die Kochbehandlung von 18 auf 12, durch die Behandlung in der Kälte von 18 auf 10. Der Niederschlag ist dabei nicht allzu stark.

Bleifällung: Die Bleifällung ergibt das gleiche Resultat wie die Formaldehyd-kalt-Fällung, $R.V._a = 18$, $R.V._e = 10$.

Aussalzen: Ganz ähnlich verlief der Aussalzversuch. Hier glichen die Resultate denen, die bei der Kochbehandlung mit Formaldehyd-Salzsäure erhalten wurden, $R.V._a = 18$, $R.V._e = 12$.

Methylenblau: 2 g Gewürz verbrauchten 1,4 ccm Methylenblau, R.V. = 7. Die qualitative Prüfung auf Eisen war negativ.

Wasserdampfdestillation: Das Destillat zeigt kein R.V., das R.V. des Rückstandes beträgt 17.

Gerbstoffreaktionen: Eine äußerst schwache Färbung mit Eisenalaun besagt, daß Gerbstoffe in nennenswerten Mengen nicht vorhanden sind. Bromwasser wird von dem Paprikaauszug entfärbt, eine Fällung oder Trübung entsteht dabei nicht. Mit basischem und selbst mit neutralem Bleiazetat (in essigsaurer Lösung) bildet sich dagegen sofort ein dichter, gallertartiger Niederschlag.

Hydrolysezahl: Aus dem Verhältnis $R.V._{HCl} = 31$ zu $R.V._E = 18$ errechnet sich HZ = 1,7.

Verdünnungskurve: Auch bei Paprika ändert sich das R.V. beim Verdünnen nicht, als Verdünnungskurve ergibt sich also auch hier eine Gerade.

Andere Paprikasorten: In den Ergebnissen für den kalten Auszug unterschieden sich zwei andere Paprikasorten nicht von der Hauptsorte, für die Werte der essigsauren Kochauszüge konnten ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

Ergebnis der Untersuchung: Die wichtigste Feststellung ist die, daß der getrocknete, saftlose Paprika im Gegensatz zu der frischen Frucht kein Vitamin C enthält, denn einer seiner Bestandteile hat darauf zerstörenden Einfluß. Außerdem beweist auch der negative Ausfall der Prune-kalt-Titration das Fehlen von Vitamin C. Da die qualitative Nachweisreaktion zeigte, daß Gerbstoffe kaum vorhanden sind, und da auch Eisen-II, reduzierende aetherische Oele und organische Schwefelverbindungen fehlen, ist das R.V. praktisch allein den Spaltprodukten der Kohlehydrate zuzuschreiben.

7. Gewürze, deren Titration mit „glatt" bezeichnet wurde.

Uebersichtshalber seien die Gewürze, deren Titration *H. Nink (3)* mit „glatt" bezeichnete, hier mit den von ihr angegebenen Werten für das R.V. von 10 g Gewürz aufgeführt:

1. Salbei	70	5. Fenchel	21
2. Muskatnuß	50	6. Kümmel	18
3. Coriander	30	7. Anis	15
4. Macis	28	8. Kapern	12

Uebereinstimmend bei allen ergab sich für die verschiedensten kalten Auszüge stets R.V. = 0. Bei der anschließenden Kochbehandlung erhielt ich in allen Fällen ein deutliches, teils höheres, teils weniger hohes R.V., das bewies, daß hier durch Hydrolyse Spaltprodukte entstanden, die überhaupt erst das R.V. bedingen. Vitamin C ist also in keinem dieser Gewürze enthalten.

Zusammenfassende Uebersicht.

Die vorliegende Arbeit bringt zuerst allgemeine Richtlinien für die Bestimmung des C-Vitamins neben störenden Stoffen, d. h. Stoffen, die genau wie das Vitamin C den Farbstoff 2,6-Dichlorphenol-indophenol reduzieren. Es sind bis jetzt bei der C-Vitamin-Bestimmung als störende Stoffe vier Hauptgruppen be-

obachtet worden: Gerbstoffe und ihre Spaltprodukte, Spaltprodukte der Kohlehydrate, organische Schwefelverbindungen und Eisen-II-salze. Viele Abhandlungen berichten darüber, wie diese Körper von dem Vitamin C abgetrennt werden können und wie man danach den wirklichen Reduktionsanteil des C-Vitamins eines bestimmten Materials berechnen kann. Alle diese Methoden wurden in logischem Zusammenhang hier angeführt und einer eingehenden Prüfung auf Brauchbarkeit unterzogen. Einige davon mußte man schon gleich nach ihrem Aufkommen wieder fallen lassen, weil sie sich als völlig unbrauchbar erwiesen. Sie wurden hier kurz erwähnt, um in Zukunft unnötige Arbeiten in dieser Richtung zu ersparen. Vielen Methoden schenkte man deshalb große Beachtung, weil sie gute Resultate zeigten bei Mischungen von Vitamin C und einem der dafür in Frage kommenden störenden Stoffe. Leider hat sich die Mehrzahl dieser Reihe aber dann in den komplizierten Mischungen, wie sie in den Naturprodukten vorliegen, nicht bewährt. Manche Methoden haben sich als gut brauchbar erwiesen und konnten unverändert beibehalten werden, andere wieder wurden präzisierter gebracht, neue Methoden kamen hinzu.

Der zweite Hauptteil der Arbeit beschäftigt sich damit, die Frage aufzuklären, inwieweit das Vitamin C am Reduktionsvermögen der Gewürze beteiligt ist. Es konnte festgestellt werden, daß in keinem der untersuchten Gewürze Vitamin C vorhanden ist, daß also das gesamte Reduktionsvermögen auf andere Stoffe zurückzuführen ist. Das absolute Fehlen der Ascorbinsäure konnte in allen Fällen einwandfrei dadurch bewiesen werden, daß die Gewürzextrakte zugesetzte Ascorbinsäure zerstörten. — Darüber hinaus konnte mit Hilfe der einzelnen Bearbeitungsarten eine weitgehende Aufklärung darüber gegeben werden, welche Körperklasse überhaupt das Reduktionsvermögen gegenüber dem Indophenolfarbstoff bewirkt.

Als wichtigste Ergebnisse sind zu verzeichnen:

1. Die Gewürze enthalten — trotz der teils recht hohen Angaben für das Reduktionsvermögen — kein Vitamin C. Ein einwandfreier Beweis für das absolute Fehlen wurde in der Ascorbinsäurezusatz-Methode gefunden.

2. Soll ein Material untersucht werden, über dessen Gehalt an Vitamin C nichts bekannt ist, dann muß man zuerst kalt mit Wasser extrahieren. Wird dabei kein Reduktionsvermögen gefun-

den, dann ist auch kein Vitamin C vorhanden. Hat der kalte wässerige Auszug aber Reduktionsvermögen, dann kann man nur aus dem Gesamtbild der Ergebnisse der einzelnen Trennungs- und Bestimmungsmethoden Schlüsse ziehen. Dabei ist es jedoch nie möglich, genau quantitativ den Gehalt an Ascorbinsäure anzugeben.

3. Es ist unmöglich, die einzelnen Trennungs- und Bestimmungsmethoden so aneinanderzureihen, daß man einen einwandfreien, schematischen Trennungsgang erhält. Dazu sind diese Methoden zu wenig spezifisch und zu wenig quantitativ. Wollte man z. B. das Vitamin C zum Schlusse allein übrig behalten, so wäre das deshalb unmöglich, weil bei den einzelnen Stufen jeweils ein Teil davon verloren ginge (Luftoxydation, mitgerissen im Niederschlag usw.) und letzten Endes nur noch ein Bruchteil des ursprünglich vorhandenen Vitamins, bei geringem Anfangsgehalt aber überhaupt nichts mehr davon, vorhanden wäre. Ganz ähnlich verhält es sich, wie aus der Beschreibung der einzelnen Methoden hervorgeht, mit den anderen reduzierenden Stoffen.

4. Alle bisher ausgearbeiteten Methoden der chemischen Bestimmung des C-Vitamins neben störenden Stoffen werden so angeführt, daß man erstens einen klaren Ueberblick über das bisher Erarbeitete hat und daß man zweitens darüber im Bilde ist, welche der Methoden brauchbar und welche unbrauchbar sind.

Die vorliegende Arbeit wurde im Universitäts-Institut für Nahrungsmittelchemie, Frankfurt a. M., auf Anregung des Instituts-Direktors,

Herrn Professor Dr. J. Tillmans,

unternommen und durchgeführt. Durch den plötzlichen Tod des Herrn Professor Dr. Tillmans kurz vor Beendigung dieser Arbeit ist es mir versagt, meinem hochverehrten Lehrer an dieser Stelle Dank zu sagen, doch spreche ich hiermit den Herren Dr. R. Strohecker und Dr. R. Vaubel für die jederzeit bereitwilligst erteilten wertvollen Ratschläge und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse herzlichen Dank aus.

Schriftennachweis.

(1) N. Bezssonoff, A. Delire: Comptes rendus des séances de l'Academie des Sciences, t. 197, p. 1774, déc. 1933.
(2) J. Tillmans, P. Hirsch, E. Reinshagen: Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel, 1928, 56, 272.
(3) H. Nink: Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1934.
(4) J. Effern: Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1934.
(5) K. Enßlin: Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1935.
(6) H. Beier: Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1934.
(7) J. Tillmans: Biochemische Zeitschrift, 1932, 250, 312.
(8) J. Tillmans, P. Hirsch, R. Vaubel: Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel, 1932, 65, 145.
(9) K. Trillhose: Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1930.
(10) F. Siebert: Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1931.
(11) L. Harris: Biochemical Journal, 1933, 27; 306, 590.
(12) J. Tillmans, P. Hirsch, W. Hirsch: Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel, 1932, 63, 1.
(13) J. Melville, G. M. Richardson: Biochemical Journal 1934, 28, 1565.
(14) W. M. Clark und Mitarbeiter: Public Health Reports, 38; 443, 666, 933, 1669. 39; 381, 804. 40; 1131.
(15) K. Freudenberg: Handbuch der Pflanzenanalyse, III, 2, 344.
(16) J. Tillmans, P. Hirsch, J. Jackisch: Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel, 1932, 63; 241, 276.
(17) Kuhn, Winterstein: B. 67, 2, 344.

Lebenslauf.

Am 3. November 1906 wurde ich in Mombach bei Mainz a. Rh. als Sohn des Chemikers und Fabrikleiters Dr. phil. Th. Harth geboren. Nachdem ich in Mainz die Reformvorschule absolviert hatte, besuchte ich von 1916 bis 1924 das Realgymnasium in Mainz. Durch die Versetzung meines Vaters nach Frankfurt a. M. war ich gezwungen, die Schule zu wechseln. Nachdem ich hier zuerst Schüler der Brunner'schen Privatschule war, besuchte ich die Ziehen-Oberrealschule in Frankfurt a. M.-Eschersheim und erhielt hier an Ostern 1927 das Zeugnis der Reife. Darauf studierte ich Chemie, und zwar zuerst in Würzburg vom S.S. 1927 ab bis W.S. 1928/29, dann im S.S. 1929 in Königsberg. Seit dem W.S. 1929/30 bin ich an der Universität Frankfurt a. M. immatrikuliert, woselbst ich auch mein chemisches Verbandsexamen ablegte. Mitte Oktober 1933 begann ich am hiesigen Universitäts-Institut für Nahrungsmittelchemie unter Leitung von Herrn Professor Dr. J. Tillmans vorliegende Arbeit.

Theo Harth.